

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DEISY ALESSANDRA DRUNKLER

PRODUÇÃO DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO

**CURITIBA
2009**

DEISY ALESSANDRA DRUNKLER

PRODUÇÃO DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Georges Kaskantzis Neto

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana O. de Farina

**CURITIBA
2009**

D795p Drunkler, Deisy Alessandra
 Produção de requeijão cremoso simbiótico [manuscrito] /
Deisy Alessandra Drunkler. – 2009.
 178f. . : il. [algumas color.] ; 30 cm.

 Impresso.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de
Alimentos, 2009.
 “Orientador: Prof. Dr. Georges Kaskantzis Neto -- Co-
orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana O. de Farina”.
 Inclui bibliografia.

 1. Queijo - Indústria. 2. Laticínios - Sabor e aroma. 3.
Culinária (Derivados do leite). I. Universidade Federal do
Paraná. II. Kaskantzis Neto, Georges, 1959-. III. Farina,
Luciana O. IV. Título.

CDD: 641.373

Bibliotecário: **Arthur Leitis Junior – CRB9/1548**

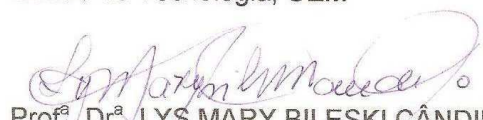
DEISY ALESSANDRA DRUNKLER

PRODUÇÃO DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador: Prof. Dr. GEORGES KASKANTZIS NETO
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof. Dr. LÚCIO CARDOZO FILHO
Centro de Tecnologia, UEM


Prof.^a Dr.^a LYS MARY BILESKI CÂNDIDO
Setor de Ciências da Saúde, UFPR


Prof.^a Dr.^a PATRÍCIA TEIXEIRA PADILHA DA SILVA PENTEADO
Setor de Ciências da Saúde, UFPR


Prof. Dr. RENATO JOÃO SOSSELA DE FREITAS
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 31 de agosto de 2009.

*Dedico este trabalho à minha família, que sempre
me mostrou que a melhor herança que se deixa
para alguém é a educação e, em especial,
ao Vanderlei e Ana Luísa, que me ensinaram
a não desistir dos meus objetivos,
cada um de sua forma.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Georges Kaskantzis Neto, pela orientação, confiança e paciência a mim dispensados durante o período da realização deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Luciana Oliveira de Farina, não só pela orientação profissional, mas também pela amizade, carinho e atenção.

Aos professores da banca, que corrigiram em tempo recorde a tese.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação, pelo repasse dos conhecimentos que contribuíram para o fortalecimento de minha formação profissional.

Ao secretário do Curso de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos, Sr. Paulo R. Krainski, pela prestatividade e competência.

Às empresas que confiaram na potencialidade deste trabalho e que, de alguma forma, patrocinaram esta pesquisa através de doações: Cooperativa Central Agropecuária - Frimesa, Purac Sínteses Indústria e Comércio Ltda.[®], Clariant[®], Chr Hansen[®] e Germinal Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda[®].

À Coordenação do Curso Superior de Tecnologia de Alimentos da UTFPR-Campus de Medianeira, por ter permitido a utilização das instalações do curso para a realização da pesquisa.

Às alunas do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos: Andrielli, Daniele, Larissa e, em especial, Renata, pela valiosa ajuda no desenvolvimento técnico e na realização das análises.

Aos ex-colegas de trabalho Fabiana, Andréia, Helena e Eduardo (e Tânia), da UNIOESTE - Campus de Cascavel, pela amizade e ajuda indispensáveis no período inicial do doutorado.

Aos colegas de trabalho da UTFPR-Campus de Medianeira, professores e técnicos, pela compreensão e auxílio, em especial à Eliane Colla e à Cristiane Canan, pelo auxílio na realização de algumas das análises deste trabalho.

Aos colegas de curso, doutorado e mestrado, pela amizade e companheirismo desenvolvidos.

Aos amigos Rosane, Miriam e Melissa que, mesmo a distância, sempre estiveram presentes e torcendo por mim.

À Sônia, Nauara e Jô, que foram a minha família em Curitiba.

Aos meus pais, Luzia e Frederico (*in memorium*), ao meu irmão Northon e esposa Juliana, por sempre me apoiarem e incentivarem na realização de meus objetivos, não deixando que eu fraquejasse nos momentos difíceis.

Ao Vanderlei e à Ana Luisa, que souberam compreender a minha ausência e foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o meu crescimento não só profissional, mas também pessoal. E, em especial, a Deus, por sempre me iluminar e estar presente durante toda a minha vida, mantendo-me firme em meus propósitos.

RESUMO

Atualmente, é crescente a preocupação por parte do mercado consumidor por alimentos que possuam propriedades funcionais. O referido fato tem levado a indústria e os pesquisadores da área de alimentos a estudarem sobre os probióticos, prebióticos e simbióticos. Logo, o objetivo principal do trabalho foi produzir requeijão cremoso simbiótico. Para tal, inicialmente, foram avaliadas a melhor forma de adição do microrganismo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (liofilizada ou 'pré-ativada') em relação à concentração (0,1 a 0,3 g/ 100 g) e a temperatura de adição (50 a 70°C) no final do processo de fusão da massa, empregando como resposta a enumeração do microrganismo probiótico, por um planejamento fatorial completo 2², com três pontos centrais. Em seguida, foram realizadas as determinações da composição centesimal e das propriedades físico-químicas das matérias-primas e do soro ácido obtido. Através de um planejamento fatorial completo 2², com três pontos centrais, foram elaboradas sete formulações de requeijão cremoso simbiótico, as quais diferiam entre si quanto à concentração de inulina e de oligofrutose, cuja faixa de variação foi de 0 a 7 g/ 100 g de requeijão. Paralelamente, foi elaborada uma Formulação Controle. As formulações do planejamento e a Formulação Controle foram submetidas à análise da composição centesimal e das propriedades físico-químicas. Os teores de inulina e de oligofrutose foram quantificados no 1º e no 60º dias de armazenamento nas formulações do planejamento adicionadas desses prebióticos. Através do planejamento, foram avaliados os efeitos das variáveis estudadas (inulina e oligofrutose) sobre as respostas: textura (firmeza, adesividade, coesividade, elasticidade e gomosidade), no 3º dia e no 60º dia de fabricação; enumeração de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, nos 1º, 15º, 30º, 45º e 60º dias de fabricação, e parâmetros sensoriais (sabor, odor, manuseio, aparência e avaliação global) no 7º dia de fabricação. Todas as formulações foram submetidas às análises microbiológicas de coliformes a 35 e 45°C e estafilococos coagulase positiva antes da realização da análise sensorial. Quanto à forma de adição do microrganismo probiótico, a 'pré-ativação' conseguiu aumentar significativamente o número de microrganismos probióticos no produto final, optando-se pelo tratamento que empregava 0,1 g de cultura probiótica/ 100 g de requeijão cremoso, ativada em leite em pó desnatado e reconstituído a 10% por incubação a 37°C/ 7 horas, à temperatura de adição de 70°C. A composição centesimal e as propriedades físico-químicas das matérias-primas e do soro ácido encontraram-se de acordo com a legislação vigente, quando ou/ quanto ao caso e à literatura consultada. Por sua vez, para as formulações do planejamento, com exceção da Formulação 01, que apresentou maior teor de umidade, e a Formulação 04, com menor teor de gordura no extrato seco do que a prevista na legislação vigente, todas as demais formulações atenderam aos padrões de identidade e qualidade preconizados pela legislação vigente para requeijão cremoso. Os teores de inulina e de oligofrutose diminuíram ao longo do armazenamento, sendo esta diminuição mais expressiva para as Formulações 02 e 03. As variáveis estudadas exerceram efeito significativo estatístico ($p \leq 0,10$) sobre os parâmetros de textura firmeza e coesividade no 3º e 60º dia de fabricação, enquanto que para adesividade somente no terceiro dia de fabricação e para elasticidade e gomosidade ao final da vida útil. Quanto à enumeração do microrganismo probiótico, todas as formulações apresentaram valores superiores a 6 log₁₀ UFC/ g durante a vida útil do produto analisado (60 dias), sendo que a inulina e a oligofrutose exerceram efeito significativo sobre a

enumeração do probiótico no 30º dia de fabricação, que coincidiu com o aumento da acidez. Em relação à qualidade microbiológica das formulações para a análise sensorial, todas elas atenderam aos padrões preditos na legislação. As formulações do planejamento não diferiram entre si quanto aos atributos avaliados ($p > 0,05$) e os valores foram próximos aos da Formulação Controle. Pelo exposto, foi possível elaborar requeijão cremoso simbiótico, atendendo aos parâmetros de identidade e qualidade preconizados pela legislação vigente, bem como com qualidade sensorial.

Palavras-chave: Queijo. Probiótico. Prebiótico.

ABSTRACT

Nowadays, there is a growing concern from the consumer market for food with functional properties. This fact has stimulated the industry and researchers in foodstuff area to study probiotics, prebiotics and synbiotics. Therefore, the main goal of this trial was to produce a synbiotic “Requeijão” cheese. So, firstly, the best way of adding the microorganism *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (lyophilized or 'pre-activated') to the concentration (0.1 to 0.3 g/ 100 g) and the temperature of addition (50 to 70°C), at the end of the mass fusion process, were evaluated, using as response the enumeration of probiotic microorganism, by a complete 2² factorial design with three main points. Then, the centesimal composition determination and physicochemical properties of raw materials were calculated as well as the obtained acid serum. According to a complete 2² factorial design, with three main points, seven formulations were prepared, which differed among themselves based on the concentration of inulin and oligofructose, whose variation ranged from 0 to 7 g/ 100 g of cheese curd. At the same time, a Control Formulation was developed. The design formulations and the control one were submitted to the analysis of centesimal composition and physicochemical properties. The inulin and oligofructose contents were measured in the 1st and 60th days of production in the formulations of the design added of these prebiotics. According to this design, the following effects of the studied variables (inulin and oligofructose) were evaluated on the responses: texture (firmness, adhesiveness, cohesiveness, springiness and gumminess), on the 3rd and 60th days of production; enumeration of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 on 1st, 15th, 30th, 45th and 60th days of production as well as sensorial parameters (taste, odor, handling, appearance and overall assessment) on the 7th day of production. All formulations were submitted to microbiological analyses of coliforms at 35 and 45°C and coagulase-positive staphylococcus before the sensorial analysis. And regarding the probiotic microorganism addition, a 'pre-activation' increased significantly the number of probiotic microorganisms to the final product. So, it was chosen a treatment that applied 0.1 g of probiotic culture / 100 g of creamy cheese curd, activated in the reconstituted skim milk powder at 10% by incubation at 37°C/ 7 hours, at a 70 °C temperature of addition. The centesimal composition and physicochemical properties of raw materials and the acid serum were found in accordance with the law, in relation to the case and consulted literature. Thus, for the design formulations, but Formulation 01, which showed the highest humidity content and formulation 04, with the lowest level of fat in total solids when compared to current law, all the other formulations met the standards of identity and quality recommended by the legislation to creamy cheese curd. The inulin and oligofructose contents decreased during storage, but this decrease was more significant for formulations 02 and 03. The studied variables showed a significant effect on the statistical parameters of texture as firmness and cohesiveness on the 3rd and 60th days of production, while for adhesiveness only the 3rd day of production and to springiness and gumminess this significant effect was only on the 60th days of production. Regarding the enumeration of probiotic microorganism, all formulations presented values over 6 log₁₀ UFC/ g during the lifetime of the studied product (60 days). The inulin and oligofructose showed a significant effect on the probiotic enumeration on the 30th day of production, which matched to an increasing acidity. In relation to the formulations microbiological quality for the sensorial analysis, all of them met the patterns already predicted in legislation. The design formulations did

not differ among themselves according to the evaluated attributes ($p \leq 0.05$) and the values were close to the Control Formulation. Therefore, it was possible to prepare a symbiotic creamy cheese curd, considering the parameters of identity and quality recommended by legislation, as well as sensorial quality.

Key words: Cheese. Probiotic. Prebiotic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA SACAROSE (1) E FRUTANAS (2 E 3). CADEIAS CURTAS DE FRUTANAS SÃO CHAMADAS DE OLIGOFRUTOSE E CADEIAS LONGAS DE INULINA.....	38
FIGURA 02 -	FLUXOGRAMA GERAL DE ELABORAÇÃO DE REQUEIJÃO CREMOSO A PARTIR DE MASSA OBTIDA POR ACIDIFICAÇÃO DIRETA A QUENTE.....	53
FIGURA 03 -	FLUXOGRAMA DO MÉTODO ENZIMÁTICO/ ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE INULINA/ OLIGOFRUTOSE.....	73
FIGURA 04 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ENUMERAÇÃO DE <i>BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (LOG10 UFC/ G) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E TEMPERATURA DE ADIÇÃO DO INÓCULO NA FORMA LIOFILIZADA EM REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO.....	85
FIGURA 05 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ENUMERAÇÃO DE <i>BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (LOG10 UFC/ G) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E TEMPERATURA DE ADIÇÃO DO INÓCULO NA FORMA “PRÉ-ATIVADA” EM REQUEIJÃO CREMOSO.....	88
FIGURA 06 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA FIRMEZA (N) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INULINA (G /100 G) E DE OLIGOFRUTOSE (G /100 G) EM REQUEIJÃO	

	CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	106
FIGURA 07 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA FIRMEZA (N) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INULINA (G/ 100 G) E DE OLIGOFRUTOSE (G/ 100 G) EM REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	110
FIGURA 08 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ADESIVIDADE (N.s) EM FUNÇÃO DA CONCENTRACAO DE INULINA (G/ 100 G) E DE OLIGOFRUTOSE (G/ 100 G) EM REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	113
FIGURA 09 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA COESIVIDADE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INULINA (G/ 100 G) E DE OLIGOFRUTOSE (G/ 100 G) EM REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	117
FIGURA 10 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA COESIVIDADE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INULINA (G/ 100 G) E DE OLIGOFRUTOSE (G/ 100 G) EM REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	119
FIGURA 11 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ELASTICIDADE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INULINA (G/ 100 G) E DE OLIGOFRUTOSE (G/ 100 G) EM REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	123

FIGURA 12 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA GOMOSIDADE (N) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INULINA (G/ 100 G) E DE OLIGOFRUTOSE (G/ 100 G) EM REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	127
FIGURA 13 -	CONCENTRAÇÃO DE PREBIÓTICOS (INULINA G/ 100 G E OLIGOFRUTOSE G/ 100 G) NAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO DURANTE ARMAZENAMENTO A $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$	128
FIGURA 14 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ENUMERAÇÃO DE <i>BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (LOG10 UFC/ G) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INULINA (G/ 100 G) E DE OLIGOFRUTOSE (G/ 100 G) PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 30 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	138
FIGURA 15 –	ÍNDICE DE ACEITABILIDADE GLOBAL (%) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO DO PLANEJAMENTO E FORMULAÇÃO CONTROLE.....	152

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 -	DELINEAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS, UTILIZADO NO DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM NÍVEIS CODIFICADOS E REAIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS (CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO LIOFILIZADO E TEMPERATURA).....	56
TABELA 02 -	DELINEAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS, UTILIZADO NO DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM NÍVEIS CODIFICADOS E REAIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS (CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO LIOFILIZADO E TEMPERATURA).....	57
TABELA 03 -	DELINEAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS, UTILIZADO NO DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM NÍVEIS CODIFICADOS E REAIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS (CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO “PRÉ-ATIVADO” E TEMPERATURA).....	58
TABELA 04 -	DELINEAMENTO <i>CENTROIDE SIMPLEX</i> UTILIZADO NO DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM NÍVEIS CODIFICADOS E REAIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS.....	59
TABELA 05 -	DELINEAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS, UTILIZADO NO DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM NÍVEIS CODIFICADOS E REAIS	

	DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS (INULINA E OLIGOFRUTOSE).....	60
TABELA 06 -	FORMULAÇÃO PADRÃO PARA A ELABORAÇÃO DE REQUEIJÃO CREMOSO.....	79
TABELA 07 -	MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS), COM A RESPOSTA ENUMERAÇÃO DE <i>BIDOBACTERIUM ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (LOG 10 UFC/ G) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM ADIÇÃO DIRETA DO INÓCULO LIOFILIZADO.....	81
TABELA 08 -	MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS), COM A RESPOSTA ENUMERAÇÃO DE <i>BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (LOG 10 UFC/ G) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM ADIÇÃO DIRETA DO INÓCULO LIOFILIZADO.....	82
TABELA 09 -	EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA A RESPOSTA ENUMERAÇÃO DE <i>BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (LOG 10 UFC/ G) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM ADIÇÃO DIRETA DO INÓCULO LIOFILIZADO.....	83

TABELA 10 -	ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA A RESPOSTA ENUMERAÇÃO DE <i>BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (LOG 10 UFC/ G) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM ADIÇÃO DIRETA DO INÓCULO LIOFILIZADO.....	84
TABELA 11 -	MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS) COM A RESPOSTA ENUMERAÇÃO DE <i>BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (LOG 10 UFC/ G) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM ADIÇÃO DE INÓCULO “PRÉ-ATIVADO”.....	86
TABELA 12 -	EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ENUMERAÇÃO DE <i>BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (LOG 10 UFC/ G) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM ADIÇÃO DO INÓCULO “PRÉ-ATIVADO”.....	87
TABELA 13 -	ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA A RESPOSTA ENUMERAÇÃO DE <i>BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (LOG10 UFC/ G) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO	

PROBIÓTICO COM ADIÇÃO DO INÓCULO “PRÉ-ATIVADO”	88
TABELA 14 - VALORES DE PH E ENUMERAÇÃO DE <i>BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (LOG 10 UFC/ G) DURANTE A INCUBAÇÃO (37°C POR 07 HORAS) E ESTOCAGEM SOB REFRIGERAÇÃO (5 ± 1°C POR 16 HORAS) EM UM SUBSTRATO COMPOSTO POR LEITE EM PÓ DESNATADO E RECONSTITUÍDO A 10%.....	90
TABELA 15 - MÉDIA DAS NOTAS OBTIDAS PARA A AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ATRIBUTOS DAS AMOSTRAS DE REQUEIJÃO CREMOSO PREBIÓTICO OBTIDAS NA ANÁLISE SENSORIAL DE ESCALA HEDÔNICA ESTRUTURADA DE 09 PONTOS.....	91
TABELA 16 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE PADRONIZADO, HOMOGENEIZADO E PASTEURIZADO, DA MASSA E DO CREME DE LEITE HOMOGENEIZADO E PASTEURIZADO UTILIZADOS NA ELABORAÇÃO DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO E DO CONTROLE, E DO SORO DE LEITE ÁCIDO.....	93
TABELA 17 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² , COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS), COM AS RESPOSTAS PARA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL REFERENTES ÀS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO E CONTROLE.....	96

TABELA 18 -	MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS), COM AS RESPOSTAS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO E CONTROLE.....	100
TABELA 19 -	MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS), COM AS RESPOSTAS FIRMEZA (N), ADESIVIDADE (N.s), COESIVIDADE, ELASTICIDADE E GOMOSIDADE (N) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO E CONTROLE UTILIZANDO A ANÁLISE DE PERFIL DE TEXTURA, COM 03 E 60 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	104
TABELA 20 -	EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO FIRMEZA (N) DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	105
TABELA 21 -	ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO FIRMEZA (N) DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	105
TABELA 22 -	EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO	

	FIRMEZA (N) DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	108
TABELA 23 -	ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO FIRMEZA (N) DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	109
TABELA 24 -	EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ADESIVIDADE (N.s) DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	111
TABELA 25 -	ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ADESIVIDADE (N.s) DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	112
TABELA 26 -	EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ADESIVIDADE (N.s) DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	114
TABELA 27 -	EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS,	

TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO COESIVIDADE PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	115
---	-----

TABELA 28 - ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO COESIVIDADE PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	116
---	-----

TABELA 29 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO COESIVIDADE DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	118
---	-----

TABELA 30 - ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO COESIVIDADE PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	118
--	-----

TABELA 31 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ELASTICIDADE DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	121
--	-----

TABELA 32 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS,	
--	--

	TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ELASTICIDADE DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	121
TABELA 33 -	ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ELASTICIDADE PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	122
TABELA 34 -	EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO GOMOSIDADE (N) PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	124
TABELA 35 -	EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO GOMOSIDADE (N) PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	125
TABELA 36 -	ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO GOMOSIDADE (N) PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	126
TABELA 37 -	MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS), COM A RESPOSTA PH PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO	

	CREMOSO SIMBIÓTICO ARMAZENADAS A TEMPERATURA DE REFRIGERAÇÃO ($5 \pm 1^{\circ}\text{C}$) DURANTE 60 DIAS.....	130
TABELA 38 -	MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS), COM A RESPOSTA ACIDEZ, EXPRESSA EM ÁCIDO LÁTICO (% M/ M), PARA CADA UMA DAS FORMULAÇÕES REFERENTES AO REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO ARMAZENADAS A TEMPERATURA DE REFRIGERAÇÃO ($5 \pm 1^{\circ}\text{C}$) DURANTE 60 DIAS.....	132
TABELA 39 -	MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS), COM A RESPOSTA ENUMERAÇÃO DE <i>BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (LOG10 UFC/ G) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO ARMAZENADAS A TEMPERATURA DE REFRIGERAÇÃO ($5 \pm 1^{\circ}\text{C}$) DURANTE 60 DIAS.....	134
TABELA 40 -	EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ENUMERAÇÃO DE <i>BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (LOG10 UFC/ G) PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 15 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	136
TABELA 41 -	EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4	

	ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ENUMERAÇÃO DE <i>BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (LOG10 UFC/ G) PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 30 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	137
TABELA 42 -	ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ENUMERAÇÃO DE <i>BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (LOG10 UFC/ G) PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 30 DIAS DE FABRICAÇÃO.....	137
TABELA 43 -	EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ENUMERAÇÃO DE <i>BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB – 12 (LOG10 UFC/ G) PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO NOS TEMPOS 03 E 04.....	140
TABELA 44 -	RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE COLIFORMES A 35°C, 45°C E ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA PARA AS DIFERENTES FORMULAÇÕES DO PLANEJAMENTO E PARA A FORMULAÇÃO CONTROLE DO REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO.....	142
TABELA 45 -	PERFIL SÓCIO-DEMOGRÁFICO DOS PROVADORES SELECIONADOS PARA A ANÁLISE SENSORIAL DAS	

DIFERENTES FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO.....	144
--	-----

TABELA 46 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² , COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS), COM AS RESPOSTAS MANUSEIO, AROMA, SABOR, APARÊNCIA E AVALIAÇÃO GLOBAL PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO UTILIZANDO A ESCALA HEDÔNICA ESTRUTURADA DE 09 PONTOS.....	146
--	-----

TABELA 47 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA OS ATRIBUTOS SENSORIAIS MANUSEIO, SABOR, AROMA, APARÊNCIA E AVALIAÇÃO GLOBAL DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO.....	149
--	-----

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	- percentagem
μm	- micrômetro
AOAC	- <i>Association Of Official Analytical Chemis</i>
BOD	- <i>biochemical oxygen demand</i>
ESD	- extrato seco desengordurado
EST	- extrato seco total
F	- formulação
g	- grama
GES	- gordura no extrato seco
kcal	- quilocaloria
L	- litro
log	- logaritmo
LPDR	- leite em pó desnatado e reconstituído
mg	- miligrama
mL	- mililitro
MRS	- Man, Rogosa e Sharpe
N	- normal
nº	- número
°C	- graus Celsius
°D	- graus Dornic
PA	- padrão analítico
pH	- potencial hidrogeniônico
ppm	- partes por milhão
rpm	- rotações por minuto
T	- tratamento
UFC	- unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	28
1.1 OBJETIVO GERAL	30
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
2 REVISÃO DE LITERATURA	32
2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS	32
2.1.1 Probióticos, prebióticos e simbióticos	33
2.1.1.1 Probióticos	34
2.1.1.1.1 Gênero <i>Bifidobacterium</i>	36
2.1.1.2 Prebióticos	37
2.1.1.2.1 Inulina e oligofrutose	37
2.1.1.3 Simbióticos	39
2.1.1.4 Emprego de probióticos, prebióticos e simbióticos em derivados lácteos	40
2.2 QUEIJOS	41
2.2.1 Queijos fundidos	43
2.2.1.1 Requeijão	44
2.2.1.1.1 Processamento tecnológico de requeijão cremoso	45
2.2.1.1.2 Principais defeitos do requeijão cremoso	49
3 MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1 MATERIAL	51
3.2 METODOLOGIA	52
3.2.1 Elaboração de requeijão cremoso	52
3.2.2 Produção de requeijão cremoso simbiótico	55
3.2.2.1 Testes preliminares	55
3.2.2.1.1 Produção de requeijão cremoso probiótico	55
3.2.2.1.2 Produção de requeijão cremoso prebiótico	58
3.2.3 Produção de requeijão cremoso simbiótico	59
3.2.4 Análise da composição centesimal e das propriedades físico-químicas	61
3.2.4.1 Procedimentos de amostragem	61

3.2.4.2 Análise das matérias-primas e do soro ácidos.....	61
3.2.4.2.1 Lipídios.....	62
3.2.4.2.2 Proteína.....	63
3.2.4.2.3 Carboidratos.....	64
3.2.4.2.4 Extrato seco total.....	64
3.2.4.2.5 Extrato seco desengordurado.....	65
3.2.4.2.6 Cinzas.....	65
3.2.4.2.7 pH.....	66
3.2.4.2.8 Acidez titulável, expressa em percentagem de ácido láctico.....	66
3.2.4.2.9 Densidade a 15°C.....	67
3.2.4.2.10 Crioscopia.....	67
3.2.4.3 Análise das formulações de requeijão cremoso simbiótico e da Formulação Controle.....	67
3.2.4.3.1 Lipídios.....	68
3.2.4.3.2 Proteína.....	68
3.2.4.3.3 Umidade e voláteis e extrato seco total.....	68
3.2.4.3.4 Cinzas.....	69
3.2.4.3.5 Cloreto de sódio.....	69
3.2.4.3.6 Gordura no extrato seco.....	70
3.2.4.3.7 pH.....	70
3.2.4.3.8 Acidez titulável, expressa em percentagem de ácido láctico.....	70
3.2.5 Avaliação do perfil de textura.....	71
3.2.6 Quantificação dos probióticos.....	72
3.2.7 Contagem das bactérias probióticas.....	74
3.2.8 Análise de pH e de acidez titulável, expressa em percentagem de ácido láctico, durante a vida útil de requeijão cremoso simbiótico.....	74
3.2.9 Análises microbiológicas.....	75
3.2.9.1 Procedimentos de amostragem.....	75
3.2.9.2 Análises microbiológicas.....	75
3.2.10 Avaliação sensorial.....	76
3.2.10.1 Equipe dos provadores, condicionamento dos tratamentos e local do teste.....	76
3.2.10.2 Avaliação da aceitabilidade de requeijão cremoso.....	77

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
4.1 TESTES PRELIMINARES.....	79
4.1.1 Produção de requeijão cremoso.....	79
4.1.2 Produção de requeijão cremoso probiótico.....	80
4.1.3 Produção de requeijão cremoso prebiótico.....	90
4.2 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.....	92
4.2.1 Análise das matérias-primas e do soro ácido.....	92
4.2.2 Análise das formulações de requeijão cremoso simbiótico e da Formulação Controle.....	95
4.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE TEXTURA.....	102
4.4 QUANTIFICAÇÃO DOS PREBIÓTICOS.....	127
4.5 ANÁLISE DE PH E DE ACIDEZ TITULÁVEL, EXPRESSA EM PERCENTAGEM DE ÁCIDO LÁTICO, DURANTE A VIDA ÚTIL DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO.....	130
4.6 CONTAGEM DAS BACTÉRIAS PROBIÓTICAS.....	133
4.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	142
4.8 ANÁLISE SENSORIAL.....	143
5 CONCLUSÕES.....	153
6 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	156
REFERÊNCIAS.....	157
APÊNDICE.....	178

1 INTRODUÇÃO

Os pesquisadores e as indústrias de alimentos, até alguns anos atrás, apenas se preocupavam com os aspectos nutricionais e sensoriais dos produtos alimentícios, visando torná-los mais atraentes para o consumo. Porém, observa-se em todo o mundo um desenvolvimento acelerado dos alimentos que apresentam, além das características anteriores, componentes ou substâncias funcionais, ou seja, que ajustam ou modulam o sistema fisiológico do organismo humano, com o intuito de prevenir doenças e promover a saúde (PARK; KOO; CARVALHO, 1997).

A microbiota intestinal está diretamente correlacionada com a manutenção das funções fisiológicas normais do organismo, o que tem levado ao aumento do interesse na manipulação das populações bacterianas do intestino que promovem bem-estar e equilibram a microbiota através do emprego dos probióticos (BIELECKA; BIEDRZYCKA; MAJKOWSKA, 2002). Entende-se por probiótico microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (Brasil, 2002). Uma alternativa para o aumento de microrganismos benéficos no trato digestório é o emprego de prebióticos, definidos como componentes alimentares que não são absorvidos nem degradados pelo trato gastrointestinal superior, mas são fermentados no intestino estimulando o desenvolvimento e/ou atividade de um número limitado de microrganismos no cólon, em especial bifidobacteria e lactobacilli, propiciando saúde ao hospedeiro (KIMURA, 2002). A veiculação conjunta de probiótico com prebiótico é definida como simbiótico (WALKER; DUFFY, 1998).

Devido aos benefícios nutricionais associados com a manipulação da microbiota, os alimentos são os principais veículos para probióticos, prebióticos e simbióticos (ZIEMER; GIBSON, 1998).

O emprego de probióticos em alimentos, em especial produtos lácteos, vem sendo objeto de estudo devido ao fato de que estes microrganismos têm sido descritos como participantes em processos que promovem melhorias na saúde, como o aumento da digestão da lactose; melhoria do sistema imunológico pelo

aumento da produção de macrófagos e elevação dos níveis de imunoglobulinas (IgG e IgA); supressão de câncer e redução do colesterol sanguíneo (COLLINS; GIBSON, 1999).

Dentre os prebióticos, a inulina destaca-se como um dos mais estudados e que apresentam efeito reconhecido em humanos (BIEDRZYCKA; BIELECKA, 2004). Além do efeito bifidogênico, o consumo destes também está correlacionado com o controle da constipação, ao mesmo tempo prevenindo diarreias, com a modulação do sistema imune e do metabolismo de lipídios e com o aumento da absorção de sais minerais (NITSCHKE; UMBELINO, 2002). A inulina apresenta funcionalidade técnica que justifica a sua adição na elaboração de produtos lácteos, podendo auxiliar na elaboração de produtos com baixo teor de gordura e alimentos *diet* (NEVEN, 2001).

Estudos têm direcionado o desenvolvimento de queijos probióticos a partir de queijos disponíveis no mercado, tais como Cheddar (ONG; HENRIKSSON; SHAH, 2006), Pategrás Argentino (BERGAMINI *et al.*, 2005), queijo Fresco Argentino (VINDEROLA *et al.*, 2000b), entre outros; ainda, acredita-se que os queijos, em função do pH mais elevado, conteúdo de gordura, nível de oxigênio, condições de estocagem, bem como sua matriz sólida, poderiam proteger o microrganismo probiótico de forma mais eficaz durante o armazenamento do alimento e, mesmo após o consumo, favorecer o trânsito pelo corpo humano (STANTON *et al.*, 1998; BOYLSTON *et al.*, 2004); indicações do emprego de prebióticos em requeijão, tais como inulina, são relatadas na literatura (NEVEN, 2001). No entanto, estudos referentes à aplicação conjunta de pré e probióticos em queijos são recentes, necessitando de maior aprofundamento.

Logo, as crescentes evidências científicas a respeito dos efeitos benéficos promovidos pelos alimentos probióticos e prebióticos, associadas à exigência por parte do mercado consumidor por alimentos ditos mais saudáveis, surgem como fatores positivos para o desenvolvimento de um requeijão cremoso simbiótico.

O trabalho abordará as etapas necessárias para a produção de requeijão cremoso simbiótico, desde a avaliação da composição centesimal e propriedades físico-químicas das matérias-primas, bem como a forma de adição e concentração e temperatura do inóculo probiótico para a obtenção de requeijão cremoso probiótico,

assim como a forma de adição do ingrediente prebiótico. O requeijão cremoso simbiótico passará por avaliação da composição centesimal e das propriedades físico-químicas e microbiológicas, avaliação sensorial e análise do perfil de textura, visando verificar se atendem aos padrões de identidade e qualidade preconizados pela legislação vigente. O acompanhamento da enumeração dos probióticos e da concentração de prebióticos durante a vida útil será realizada, com o intuito de avaliar a viabilidade do requeijão cremoso como carreador de microrganismo probiótico e ingrediente prebiótico.

1.1 OBJETIVO GERAL

Produzir requeijão cremoso simbiótico.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar a formulação padrão de requeijão cremoso.
- 2) Determinar a formulação de requeijão cremoso probiótico através da avaliação da forma de adição da cultura probiótica (liofilizada ou “pré-ativada”), estudando os efeitos das variáveis concentrações de inóculo e temperatura de adição na resposta contagem de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (UFC/g) a partir de um planejamento experimental fatorial completo, do tipo 2^2 , com três pontos centrais.
- 3) Determinar a faixa e a forma de adição dos prebióticos através da formulação de requeijão cremoso prebiótico utilizando o delineamento experimental *centroide simplex*.

- 4) Avaliar a composição centesimal e as propriedades físico-químicas do leite de vaca padronizado, homogeneizado e pasteurizado, do creme de leite pasteurizado e homogeneizado e da massa de queijo a serem utilizados como matéria-prima na elaboração de requeijão cremoso simbiótico, bem como do soro ácido.
- 5) Verificar os efeitos das variáveis inulina e oligofrutose, na faixa de concentração de 0 a 7 g/ 100 g de requeijão cremoso, sobre as respostas perfil de textura (fimeza, adesividade, coesividade, elasticidade e gomosidade), a contagem de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e análise sensorial (manuseio, aroma, sabor, aparência e avaliação global) a partir de um planejamento experimental fatorial completo, do tipo 2^2 , com três pontos centrais, visando determinar a melhor formulação para elaboração de requeijão cremoso simbiótico.
- 6) Determinar a composição centesimal e as propriedades físico-químicas das formulações do planejamento e Formulação Controle.
- 7) Analisar as formulações microbiologicamente visando determinar a segurança aos julgadores para realização da análise sensorial.
- 8) Verificar a validade deste derivado lácteo como produto simbiótico através do acompanhamento da relação inicial microrganismo probiótico e prebióticos durante a vida útil do produto elaborado (60 dias).
- 9) Avaliar os parâmetros de pH e acidez titulável, expressa em percentagem de ácido láctico, durante a vida útil do produto (60 dias).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Existe uma crescente percepção da estreita relação entre alimentação e saúde, quer por parte dos pesquisadores, quer por parte dos consumidores. Por parte dos pesquisadores em alimentos, inúmeros estudos vêm correlacionando os efeitos da alimentação sobre a saúde da população, efeitos estes que podem estar associados com aumento da ocorrência de doenças crônico-degenerativas (MONTEIRO; MONDINI; COSTA, 2000) ou com prevenção destas (ANGELIS, 2001). Por parte dos consumidores, em nenhum momento a alimentação exerceu tanto impacto no quesito saúde como nos últimos anos. Em uma pesquisa realizada com a população americana, 75% dos entrevistados acreditam mais na influência da alimentação sobre a saúde do que a do exercício (66%) ou da história familiar (43%). Ainda, nessa mesma pesquisa, visando melhorar a saúde através da alimentação, vários pesquisados, em algum momento, reduziram ou aumentaram a ingestão de determinados alimentos (IFIC, 2007).

Desta forma, o desenvolvimento de alimentos que apresentem além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produza efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, vem encontrando destaque junto à indústria alimentícia e aos consumidores de alimentos. Estes alimentos são denominados de alimentos funcionais (STRINGUETA *et al.*, 2007). A legislação brasileira não define alimentos funcionais, porém define propriedade funcional e propriedade de saúde. Ainda, reforça que o alimento ou ingrediente que apresenta alegação de propriedade funcional, além de atuar em funções nutricionais básicas, deverá desencadear efeitos benéficos à saúde e ser também seguro para o consumo sem supervisão médica (BRASIL, 1999).

O mercado de alimentos funcionais encontra-se em profunda expansão. Dentre os principais mercados encontram-se o Japão, Estados Unidos e a Europa. Somente em 2005, movimentou cerca de US\$ 60 bilhões no mundo e no Brasil US\$ 600 milhões, com perspectiva de crescimento de 20% ao ano (SALGADO; ALMEIDA, 2008).

Inúmeros alimentos e ingredientes alimentares vêm sendo correlacionados com a capacidade de apresentarem propriedade funcional, dentre eles destaque especial vem sendo dado aos probióticos, prebióticos e simbióticos.

2.1.1 Probióticos, prebióticos e simbióticos

O intestino humano é colonizado por um grande número de microrganismos, cerca de 500 a 1000 diferentes espécies (KELLY; KING; AMINOV, 2007), envolvidos com inúmeras funções fisiológicas, em especial, do ponto de vista do hospedeiro, a prevenção da colonização pelos microrganismos potencialmente patogênicos (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2002; SALMINEN; ISOLAURI, 2006), facilitando assim o desenvolvimento de uma microbiota mais benéfica (LOSADA; OLLEROS, 2002). Esta proteção pode ser afetada por alguns fatores, como quimioterapia, doenças crônicas, estresse, entre outros. Devido a isso, conduziu-se ao desenvolvimento de alimentos especificamente designados para fortalecer a microbiota intestinal, destacando-se os probióticos, prebióticos e simbióticos (TUOHY *et al.*, 2003).

2.1.1.1 Probióticos

O termo probiótico compreende microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002a). Pode-se estender este conceito acrescentando que os mesmos não podem ser patogênicos e que os efeitos benéficos para o hospede, via balanço da microbiologia intestinal, estão correlacionados com a quantidade ingerida e sugerida na faixa entre 10^5 a 10^6 células viáveis por mL ou g de produto. Os padrões japoneses exigem um mínimo de 10^7 células viáveis do microrganismo por mL ou g do produto (SHAH; LANKAPUTHRA, 1997; DAVE; SHAH, 1997). Até julho de 2008, não havia legislação que preconizasse a concentração mínima de microrganismo probiótico que um alimento deveria apresentar para ser considerado probiótico, quando então a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) atualizou a Lista de Alegações de Propriedade Funcional, que diz que para um alimento ser considerado probiótico e atuar no equilíbrio da flora intestinal este deve apresentar quantidade mínima viável para estes microrganismos na faixa de 10^8 a 10^9 UFC/ g ou mL na recomendação diária do produto pronto para consumo, conforme indicação do fabricante (BRASIL, 2008). Estes altos números têm sido sugeridos para compensar a possível redução nos números de organismos probióticos durante a passagem pelo estômago e intestino (SHAH, 2000).

Para um microrganismo ser considerado probiótico, deve apresentar as seguintes características: ter por *habitat* natural o trato intestinal humano; ser de fácil proliferação *in vitro* (produção); permanecer viável durante processamento, estocagem e preparo do alimento; ocasionar bom sabor e aroma depois da fermentação dos produtos; sobreviver à passagem pelo trato digestório superior (ser resistente ao suco gástrico e à bile, por exemplo); colonizar e/ou proliferar no trato digestório; não ser patogênico, toxigênico ou carcinogênico; não ser absorvido no trato digestivo, nem invasivo; ser geneticamente estável, não sofrer mutações nem perda de potencial contra bactérias patogênicas (LEE; SALMINEN, 1995; KALANTZOPOULUS, 1997; SHORTT, 1999; GIBSON; FULLER, 2000; BENGMARK, 2000).

Dentre os microrganismos comumente descritos com características probióticas, destacam-se as bactérias produtoras de ácido láctico, particularmente os gêneros originários do intestino humano, tais como *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*), *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. animalis*) e *Streptococcus*, ou *Enterococcus*; na forma de culturas simples ou mistas usualmente adicionadas em produtos lácteos fermentados (SCHEINBACH, 1998).

Estes microrganismos têm sido correlacionados com diferentes processos benéficos à saúde; no entanto, os mecanismos de ação estão associados ao tipo de microrganismo probiótico, ao método de produção, ao método de administração, à viabilidade da preparação e à condição da microbiota intestinal (DRUNKLER; SENE; OLIVEIRA, 2005).

Dentre os efeitos benéficos, destacam-se o aumento da digestão da lactose (SULLIVAN; NORD, 2002); o reequilíbrio da microbiologia intestinal, com consequente diminuição da incidência de diarreia (SAAVEDRA, 2000; SCHIFFRIN; BLUM, 2001) e ação contra patógenos (FOOKS; GIBSON, 2002); melhoria do sistema imunológico (PERDIGON *et al.*, 1995; COLLINS; GIBSON, 1999; DUGAS *et al.*, 1999; POHJAVUORI *et al.*, 2004); tratamento e prevenção de alergias (MATRICARDI, 2002; VANDERHOOF; YOUNG, 2003); atividade antitumoral e anticarcinogênica (HIRAYAMA; RAFTER, 2000; RAFTER, 2003; BURNS; ROWLAND, 2004; COMMANE *et al.* 2005); redução do colesterol sanguíneo (PEREIRA; GIBSON, 2002; TARANTO *et al.*, 1998); aumento da absorção de cálcio, da síntese de vitaminas (principalmente do complexo B e folato) e predigestão de proteínas (GORBACH, 2000).

Deve ser apontado que a eficácia dos probióticos está condicionada pela presença de substrato necessário para a fermentação e desenvolvimento de suas funções metabólicas (LOSADA; OLLEROS, 2002). Isto inclui o conceito de prebióticos, que são substâncias não digeridas pelas enzimas humanas e estimulam o crescimento e colonização dos probióticos (RASTALL; MAITIN, 2002).

2.1.1.1.1 Gênero *Bifidobacterium*

O gênero *Bifidobacterium* foi primeiramente isolado por Tissier em 1899, a partir de fezes de lactentes e sua presença no trato digestório tem sido associada com uma microbiota saudável (KLIJN; MERCENIER; ARIGONI, 2005).

São microrganismos anaeróbicos, catalase negativa, gram-positivos, não produtores de gás, não formadores de esporos. Apresentam-se como bacilos curtos e curvados, bacilos com a forma de bastão e bacilos bifurcados. Cerca de 30 espécies são incluídas neste gênero, onde dez são de origem humana (cárie dental, fezes e vagina), 17 do trato digestório ou do rúmen animal, duas de águas residuais e uma do leite fermentado. São microrganismos sacarolíticos que produzem ácido acético sem geração de CO₂ (a partir de dois moles de hexose resultam em três moles de acetato e dois moles de lactato). Além da glicose, podem também fermentar galactose, lactose e, usualmente, frutose; e algumas espécies utilizam-se de carboidratos complexos. O pH ótimo de crescimento está na faixa de 6-7, com crescimento mínimo abaixo de 4,5-5,0 e acima de 8,0-8,5. A temperatura ótima varia de 37-41°C, suportando temperatura máxima de 43-45°C e apresentando crescimento mínimo ou ausente abaixo de 25-28°C (GOMES; MALCATA, 1999).

Dentre os microrganismos deste gênero, as espécies mais utilizadas industrialmente são *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* biotipos *longum* e *infantis* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, sendo esta última a de maior aplicação (MASCO *et al.*, 2005), provavelmente porque apresenta boa sobrevivência no trato digestório e tolerância ao baixo pH e oxigênio (MATTO *et al.*, 2006).

2.1.1.2 Prebióticos

Os prebióticos podem ser definidos como componentes alimentares que não são absorvidos e nem degradados pelo trato gastrointestinal superior; são fermentados no intestino estimulando seletivamente o desenvolvimento e/ou atividade de um número limitado de microrganismos no cólon (FERREIRA; TESHIMA, 2000).

Para um substrato dietético ser classificado como um prebiótico ao menos três critérios devem ser preenchidos: o substrato não deve ser hidrolisado ou absorvido no estômago ou intestino delgado; deve ser seletivo para bactérias comensais benéficas no cólon, tais como bifidobactéria; e a fermentação do substrato deve induzir efeitos sistêmicos/ luminais benéficos para o hóspede (MANNING; GIBSON, 2004).

Destacam-se como prebióticos carboidratos não digeríveis (ROBERFROID; SLAVIN, 2000), alguns peptídios e proteínas, bem como certos lipídios (ZIEMER; GIBSON, 1998). Entre os carboidratos, muitos oligossacarídeos possuem propriedades prebióticas, como a inulina e a oligofrutose, os mais estudados (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002).

2.1.1.2.1 Inulina e oligofrutose

Quimicamente, são carboidratos formados por cadeias de β -D-frutanas unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(2-1)$. Dependendo do comprimento da cadeia, podem ser classificados como inulina (grau de polimerização entre 10 e 60) ou oligofrutose (grau de polimerização entre 2 e 9) (FIGURA 01) (BIEDRZYCKA; BIELECHA, 2004). A inulina é comumente obtida a partir da raiz de chicória; a

oligofrutose, por sua vez, pode ser obtida por processos enzimáticos a partir da hidrólise da inulina ou a partir da sacarose (NITSCHKE e UMBELINO, 2002).

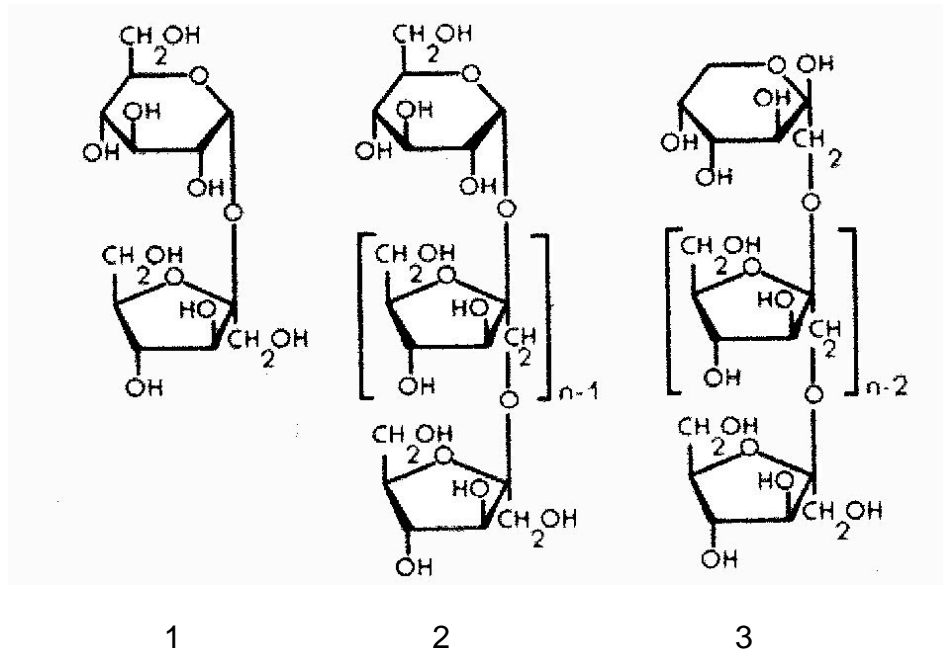


FIGURA 01 - ESTRUTURA QUÍMICA DA SACAROSE (1) E FRUTANAS (2 E 3). CADEIAS CURTAS DE FRUTANAS SÃO CHAMADAS DE OLIGOFRUTOSE E CADEIAS LONGAS DE INULINA

FONTE: NITSCHKE; UMBELINO (2002).

Diversos benefícios fisiológicos têm sido associados ao consumo destes prebióticos, dentre eles: controle da constipação, ao mesmo tempo prevenindo diarreias (NITSCHKE; UMBELINO, 2002); efeito bifidogênico (RAO, 2001); diminuição do processo inflamatório (GUIGOZ *et al.*, 2002); efeito anticarcinogênico (LOSADA; OLLEROS, 2002); aumento da absorção de sais minerais, em especial o cálcio (ROBERFROID; SLAVIN, 2000; BOSSCHER *et al.*, 2003; BOSSCHER; VAN LOO; FRANCK, 2006); modulação do metabolismo de lipídeos (CAUSEY *et al.*, 2000). Carabin e Flamm (1999) enfatizam que oligossacarídeos são destituídos de toxicidade aguda ou crônica, bem como carcinogenicidade e teratogenicidade.

Apesar da literatura não entrar em um consenso quanto à concentração mínima a ser ingerida para que inulina e oligofrutose exerçam efeitos benéficos acima mencionados, a ANVISA, através da Lista de Alegações de Propriedade

Funcional, descreve que a porção do produto pronto para consumo deve fornecer, no mínimo, 3 g de inulina se o alimento for sólido ou 1,5 g se o alimento for líquido, para que possa ser especificado no rótulo que o produto contribui para o equilíbrio da flora intestinal.

2.1.1.3 Simbióticos

Os simbióticos são considerados alimentos funcionais compostos por probióticos em um veículo apropriado contendo um ingrediente prebiótico (KIMURA, 2002). Assim, a administração conjunta de um probiótico com um prebiótico específico pode favorecer o desenvolvimento *in situ* dos probióticos, aumentando a sobrevivência e a implantação destes no trato digestório (ZIEMER; GIBSON, 1998; ROBERFROID, 1998) através do estímulo seletivo do crescimento e/ou ativação do metabolismo de um ou número limitado de microrganismos promotores de saúde (MATSUBARA, 2001; TUOHY *et al.*, 2003).

Poucos estudos correlacionam o efeito benéfico dos simbióticos para a saúde. Dentre estes, Burns e Rowland (2004) verificaram que *in vitro* o *Lactobacillus plantarum* e os probióticos à base de inulina e oligofrutose foram mais eficientes no aumento da resistência celular à genotoxicidade da água fecal quando comparado com o *L. plantarum* sozinho. A realização de mais estudos nesta área torna-se, portanto, necessária.

2.1.1.4 Emprego de probióticos, prebióticos e simbióticos em derivados lácteos

A utilização de probióticos e prebióticos vem sendo prática corrente na indústria de laticínios e nos centros de pesquisa; mas poucos estudos vêm sendo realizados para a utilização de simbióticos.

O emprego tecnológico de probióticos está condicionado à sobrevivência destes microrganismo durante as etapas de produção, vida útil e passagem pelo trato digestório, bem como à manutenção das qualidades sensoriais do produto. Estas características estão correlacionadas com procedimentos que devem ser adotados, tais como selecionar corretamente a cepa a ser utilizada, a forma e o momento de adição, a temperatura de produção e armazenamento do produto alimentício, matriz alimentícia, entre outros (DRUNKLER; SENE; OLIVEIRA, 2005).

Produtos como iogurte (HEKMAT; REID, 2006) e bebidas lácteas fermentadas (AWAISHEH; HADDADIN; ROBINSON, 2005) foram os derivados lácteos mais amplamente utilizados para esta finalidade. No entanto, o baixo pH dos produtos lácteos fermentados pode ser inadequado à sobrevivência de alguns microrganismos probióticos (BERGAMINI *et al.*, 2005).

Tal fato tem levado ao emprego de probióticos em outros derivados lácteos, como o queijo, o qual vem demonstrando ser melhor alternativa na veiculação destes microrganismos. O pH mais elevado, teor mais alto de gordura e a matriz sólida do queijo podem proteger as bactérias mais eficientemente do que um meio fluído durante o armazenamento e, quando consumido, a passagem pelo trato digestório (STANTON *et al.*, 1998).

Diferentes queijos vêm sendo utilizados como veículos de microrganismos probióticos, dentre eles Cheddar (ONG; HENRIKSSON; SHAH, 2006), queijo fresco argentino (VINDEROLA *et al.*, 2000b), queijo Minas Frescal (BURITI *et al.*, 2005), Pategrás argentino (BERGAMINI *et al.*, 2005), queijo branco (KASYMOGLO; GONCUOGLO; AKGUN, 2004), entre outros.

Em relação às propriedades tecnológicas da inulina, por possuir cadeia longa, pode formar microcristais quando misturada em água ou leite, produzindo um gel estável, de comportamento reológico viscoelástico, o qual imita muito bem a gordura, justificando o emprego de inulina na elaboração de produtos alimentícios com teor reduzido de gordura (ROBERFROID, 2005; KIP; MEYER; JELLEMA, 2006). Em produtos como requeijão cremoso e queijo processado, a utilização da inulina aumenta o corpo, fornece um paladar mais cremoso e um sabor mais balanceado (NINESS, 1999; ROBERFROID; SLAVIN, 2000; NEVEN, 2001). A inulina, além de baixo valor calórico (1,5 kcal/ g), possui a vantagem adicional de apresentar doçura 0,3 vezes em relação à sacarose (CARABIN; FLAMM, 1999). O poder adoçante da oligofrutose equivale a 30-50% ao da sacarose, é mais higroscópica que esta, não cristaliza, precipita ou deixa sensação arenosa ao paladar e, por não ser digerível, sua contribuição calórica é mínima (NINESS, 1999).

Poucas pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de verificar a viabilidade de derivados lácteos simbióticos. Aragon-Alegro *et al.* (2007) verificaram que o mousse de chocolate pode atuar como carreador de microrganismo probiótico (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) e ingrediente prebiótico (inulina). Buriti *et al.* (2007) avaliaram a viabilidade de inulina em queijo fresco cremoso adicionado de *Lactobacillus paracasei* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* e constataram a potencialidade deste produto como simbiótico, devido ao fato de que a inulina manteve-se inalterada e nas concentrações necessárias para efeito prebiótico, assim como o microrganismo probiótico. Cardarelli *et al.* (2007) verificaram a potencialidade do queijo *Petit Suisse* como carreador de microrganismos probióticos e agentes prebióticos. Logo, estudos adicionais são necessários.

2.2 QUEIJOS

Aproximadamente um terço da produção mundial de leite é empregado na elaboração de queijos, que chega a representar 30% dos produtos lácteos comercializados (FARKYE, 2004).

Inúmeras são as definições para queijo, mas segundo a Portaria nº 146, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o queijo pode ser definido como o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

Embora o processo básico de fabricação de queijos seja comum a quase todos, variações na origem do leite, nas técnicas de processamento e no tempo de maturação criam a imensa variedade conhecida de queijos (cerca de 1.000 tipos) (PERRY, 2004) e, conseqüentemente, diversas classificações, algumas extremamente complexas.

A legislação brasileira específica (BRASIL, 1996) classifica os queijos de acordo com o conteúdo de gordura no extrato seco e com o teor de umidade em:

a) De acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco (%):

- Extra gordo ou duplo creme: quando contenham o mínimo de 60%
- Gordos: quando contenham entre 45,0% e 59,9%
- Semigordo: quando contenham entre 25,0% e 44,9%
- Magros: quando contenham entre 10,0% e 24,9%
- Desnatados: quando contenham menos de 10,0%

b) De acordo com o conteúdo de umidade (%):

- Queijo de baixa umidade (queijo de massa dura): até 35,9%.
- Queijos de média umidade (queijo de massa semidura): entre 36,0% e 45,9%.
- Queijos de alta umidade (queijo de massa branda ou “macios”): entre 46,0% e 54,9%.
- Queijos de muita alta umidade (queijo de massa branda ou “mole”): não inferior a 55,0%.

Uma das formas mais práticas de classificar os queijos é a adotada por Furtado (1990), conforme abaixo especificado:

- a) queijos de massa fresca, que devem ser consumidos rapidamente (brancos, como os de minas, ou os franceses (*Petit Suisses*);
- b) queijos de massa mole, de forte fermentação inicial, cura prolongada, muitas vezes recobertos de mofo branco (*Brie, Camembert, Maroilles*);
- c) queijos de massa firme, que contêm menos água e mais sais minerais, os quais apresentam duas subdivisões: de massa firme crua, prensados de casca seca (*Gouda, Cheddar*), prensados de casca lavada (*Saint-Paulin*) e não prensados (*Bel Paese*); e de massa firme cozida (*Emmenthal, Parmesão*);
- d) queijos cuja massa apresenta veios azulados ou esverdeados (*Roquefort, Gorgonzola*);
- e) queijos fundidos.

2.2.1 Queijos fundidos

Os queijos fundidos, também denominados de queijos processados, são tradicionalmente obtidos pela mistura de queijos com sais fundentes e água sob a influência do calor e agitação (LEE; KLOSTERMEYER, 2001). Podem ser caracterizados segundo a sua composição, principalmente quanto ao conteúdo de umidade e gordura, e valor de pH, o que resulta em queijos de diferentes consistências (RABÊLO *et al.*, 2002). De acordo com estes critérios, podem ser classificados nos seguintes grupos: queijos processados de corte ou em bloco, queijos processados untáveis e análogos de queijos processados (MIRALLES; RAMOS; AMIGO, 2000).

Embora, inicialmente, os queijos fundidos tenham sido elaborados a partir de variedades de queijos duros com diferentes graus de maturação e de diferentes

misturas de queijos, obtidos por processos de coagulação enzimática, os queijos fundidos podem ser elaborados a partir de queijos obtidos por acidificação direta (ASHRAF PAL, 2002). Dentre os queijos fundidos amplamente comercializados no mercado nacional destaca-se o requeijão (BARONI *et al.*, 1999).

2.2.1.1 Requeijão

O requeijão é um produto tipicamente brasileiro, fabricado praticamente em todo o território nacional, com algumas variações de tecnologia e características de região para região (MUNCK; CAMPOS, 1984).

Com o nome de requeijão encontram-se queijos no mercado com diferentes teores de umidade, desde bem cremosos sem consistência até bastante firmes possíveis de serem cortados em fatias, como é o caso do requeijão do Norte (OLIVEIRA; 1990).

A legislação brasileira, através da Portaria nº 359, de 04 de setembro de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, define requeijão como “o produto obtido pela fusão da massa coalhada, cozida ou não, dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite opcionalmente adicionada de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou *butter oil*. O produto poderá estar adicionado de condimentos, especiarias e/ou outras substâncias alimentícias” (BRASIL, 1997). A mesma ainda classifica o requeijão, de acordo com as matérias-primas empregadas no processo de elaboração, teor de gordura no extrato seco e teor de umidade em: requeijão, requeijão cremoso e requeijão de manteiga.

Dentre os requeijões comercializados no Brasil, destaca-se o requeijão cremoso como o mais tradicional e de amplo consumo (RAPACCI, 1997). Segundo Oliveira (1990), um requeijão cremoso típico apresenta cerca de 45% de umidade, 30% de gordura, 23% de proteína, 2% de sal e pH entre 5,3-5,5.

2.2.1.1.1 Processamento tecnológico de requeijão cremoso

Na elaboração de requeijão cremoso, empregam-se como matéria-prima o leite e/ ou leite reconstituído (BRASIL, 1997). Dentre as espécies, o leite de vaca é o mais utilizado, apesar de ser possível elaborar este produto a partir de leite de cabra (DRUNKLER *et al.*, 2006) e de leite de búfala (SOUSA *et al.*, 2002).

Tradicionalmente, trabalha-se com matéria-prima desnatada, prática esta proveniente da época em que a manteiga era o derivado mais valorizado do leite. No entanto, a utilização de leite desnatado justifica-se, também, devido às perdas de gordura no soro durante a etapa da dessoragem, resultantes da separação da gordura durante o processo de coagulação (OLIVEIRA, 1990). Estas perdas podem ser minimizadas trabalhando-se com leite homogeneizado. A homogeneização do leite visa à redução do tamanho dos glóbulos de gordura de 3-10 μm para um diâmetro inferior a 2 μm , resultando em um aumento da área superficial de cerca de 5 a 10 vezes, apresentando alta energia livre interfacial, de forma que as micelas de caseína, ou submicelas, e, em menor extensão, as proteínas do soro sejam adsorvidas. Desta forma, estes “novos” glóbulos de gordura comportam-se como grandes micelas de caseína no que diz respeito às suas propriedades superficiais. Logo, qualquer fator que leve a agregação das micelas de caseína (coagulação ácida ou enzimática) também levariam a agregação da gordura homogeneizada e, desta forma, reduzindo as perdas no soro (DRUNKLER; KATSUDA; DRUNKLER, 2005).

A qualidade do leite empregado exerce forte influência no processamento e nas características básicas desses produtos, no que se refere aos atributos de aparência, consistência, textura, sabor, aroma, bem como na sua vida útil, sendo praticamente impossível obter produto de excelente qualidade a partir de matéria-prima de má qualidade. Dentre os parâmetros básicos, o leite empregado na elaboração de requeijão deve apresentar acidez titulável entre 13 – 18 graus Dornic ($^{\circ}\text{D}$), pH 6,5 - 6,7, baixo número de microrganismos mesofílicos e ausência ou

presença mínima de microrganismos esporogênicos anaeróbios (MORENO *et al.*, 2006).

Uma vez obtida a matéria-prima, parte-se para a elaboração da massa, que será submetida à fusão com a adição dos demais ingredientes para a fabricação do requeijão cremoso.

Embora no mercado existam alguns requeijões fabricados a partir de massa obtida por coagulação enzimática, os mais comuns são aqueles fabricados utilizando massa proveniente de coagulação ácida, por adição de culturas lácticas ou por acidificação direta do leite com ácido láctico a quente (OLIVEIRA, 1990). A acidificação direta do leite com ácido láctico a quente é o método mais utilizado. Em estudo comparativo realizado por Rapacci (1997), a acidificação direta a quente demonstrou ser uma técnica bastante prática de coagulação das proteínas do leite, devido, principalmente, à redução do tempo e simplicidade do método de obtenção da massa, quando comparado com o processo de acidificação por fermentação láctica.

A coagulação por acidificação direta caracteriza-se pela neutralização das cargas negativas das caseínas até o ponto isoelétrico das mesmas (pH 4,6) (AMIOT, 1991), mediante adição de ácidos orgânicos, em especial o ácido láctico. No entanto, a coagulação por acidificação direta depende da temperatura e do equilíbrio salino (SCOTT; ROBINSON; WILLEY, 2002), o que explica o fato de que a coagulação por acidificação direta a quente promove a formação de um coágulo com pH superior a 4,6 (ORDÓNEZ PEREDA *et al.*, 2006). O aumento do ponto isoelétrico das frações de caseína com o aquecimento do leite ocorre, presumivelmente, devido à associação das frações de caseína com as proteínas do soro (VAN DENDER *et al.*, 2006). À temperatura de 82°C, a coagulação do leite desnatado ocorre quando a concentração de ácido láctico atingir 0,25% (SCOTT; ROBINSON; WILLEY, 2002). Logo, a coagulação ácida permite uma maior recuperação de proteínas solúveis na forma de co-precipitado com a caseína (SILVA; VAN DENDER; MELO, 2004).

Como a coagulação das proteínas do leite é efetuada quase que instantaneamente após a adição do ácido láctico, a dessora é realizada logo após a completa precipitação a 80°C, seguida da prensagem (RAPACCI, 1997).

A massa, assim obtida, é submetida à moagem, que possibilita o contato íntimo do sal fundente com a mistura da massa durante o processamento, seguida da adição dos ingredientes e o processo de fusão propriamente dito (RAPPACI, 1997).

A gordura, na forma de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite, é ingrediente obrigatório na elaboração de requeijão cremoso, uma vez que o produto deve apresentar, no mínimo, 55% de gordura no extrato seco (BRASIL, 1997), e deve ser adicionada antes da fusão, onde a quantidade dependerá do teor de gordura desejado (OLIVEIRA, 1990).

O cloreto de sódio normalmente é adicionado na proporção de 1,5% - 2,0% em relação à massa a ser fundida, na forma de solução ou mesmo polvilhada sobre a mesma (VAN DENDER *et al.*, 2006).

A água desempenha importante papel no processamento tecnológico do requeijão, uma vez que auxilia na dissolução dos sais emulsificantes, na hidratação das proteínas e na dispersão dos componentes (LEE; ANEMA; KLOSTERMEYER, 2004), bem como o teor de umidade influencia na firmeza do produto final, pois está correlacionada com o conteúdo de extrato seco desengordurado (RABÊLO *et al.*, 2002). Pode ser adicionada tanto de uma só vez, no início do processo de fusão, como em duas vezes, ou seja, metade no início e a outra metade próxima ao final do processo. Este último procedimento é mais vantajoso uma vez que a absorção de caseína é acelerada, pois o sal fundente se encontra mais concentrado quando se adiciona só metade da água no início do processo (VAN DENDER *et al.*, 2006).

Os sais fundentes, na forma de sal sódico, sob agitação constante e calor, promovem uma troca interna de íons, transformando o paracaseinato de cálcio, de hidratação instável, em paracaseinato de sódio, cuja solução é coloidal e estável (DIMITRELI; THOMAREIS, 2004). Quanto aos glóbulos de gordura, a membrana destes é destruída perto dos 70 - 80°C, mas um novo invólucro, constituído, sobretudo, por paracaseinato de sódio, a substitui depois (ECK, 1987). A habilidade de sequestrar cálcio é uma das mais importantes funções dos agentes de fusão (SILVA; FURTADO; SOUZA, 2003). Logo, os sais fundentes são empregados para dispersar os componentes durante o processo de fusão e conferir estabilidade à emulsão, evitando-se, assim, que o queijo se dissocie em seus componentes

principais (proteína, gordura e água) ao aquecer-se. Estes sais ainda fixam o pH do queijo fundido, que deve estar entre 5,2 - 6,0, pois se não atingir o pH desejado dispersa-se com demasiada lentidão resultando em um queijo fraco e quebradiço, um pH muito elevado acelera demais a fusão, dando lugar a uma massa esponjosa, semelhante a *flan* (SPREER, 1991).

Em geral, utilizam-se dois sais fundentes, comumente na forma de mistura, os citratos dissódicos e trissódicos em solução aquosa, que originam queijo firme ao corte, e os fosfatos, mais comum polifosfato que monofosfato e difosfato, que apresentam bom poder de dispersão, de tal maneira que os processos de hidratação se desenvolvem com rapidez e uniformemente (ECK, 1987).

O tratamento térmico caracteriza-se pela fusão e cozimento da massa. Pode-se utilizar aplicação indireta ou direta de calor na forma de vapor. O uso de vácuo durante o aquecimento é opcional e pode ser utilizado para regular a quantidade de umidade, quando é feita a injeção direta de vapor na massa e também para remoção de ar da massa (ALVES, 2004). A fusão propriamente dita é realizada através do aquecimento e agitação vigorosa da massa, utilizando uma temperatura mínima de 80°C durante 15 segundos, ou qualquer outra combinação tempo/ temperatura equivalente (BRASIL, 1997); deve ser rápida e a agitação deve ser de forma a evitar a queima da massa e promover uma completa homogeneização do produto (OLIVEIRA, 1990). Em processamento por batelada, a combinação de tempo/ temperatura varia (70 - 95°C/ 4 - 15 minutos), dependendo da formulação, do nível de agitação e das características desejadas no produto final em termos de textura, consistência e vida útil. No processo contínuo, a mistura é aquecida a 80 - 90°C em um misturador a vácuo e deste é bombeado para uma bateria de trocadores de calor tubulares onde é aquecida a 130-145°C por poucos segundos, sendo, na sequência, rapidamente resfriado a 90°C (ALVES, 2004).

O processo de cremificação é um fenômeno físico-químico no qual resulta em um aumento da viscosidade devido à hidratação das proteínas, decorrente da quelação do cálcio e da reação de troca iônica promovida pelos sais fundentes, bem como um aumento das interações proteína – proteína (LEE *et al.*, 2003; VAN DENDER *et al.*, 2006).

Quando ainda quente, o requeijão é fluido e nestas condições é então envasado (OLIVEIRA, 1990). Dentre os materiais empregados no envase de requeijão destacam-se os copos de vidro, com ou sem sistema de abertura fácil, copos termoformados de polipropileno e tubos de polietileno (ALVES *et al.*, 2007).

O resfriamento deste produto deve ser feito o mais rápido possível e normalmente é realizado abaixo de 10°C, embora a utilização destas temperaturas possa promover a formação de cristais (VAN DENDER *et al.*, 2006).

Com relação ao armazenamento do requeijão cremoso, este requer refrigeração da mesma forma que a maioria dos queijos processados; entretanto, a sua conservação é bem maior quando mantido hermeticamente fechado. Depois de aberto, a sua conservação é limitada a cerca de uma semana, mesmo sob refrigeração adequada (RAPACCI, 1997).

2.2.1.1.2 Principais defeitos do requeijão cremoso

Um requeijão cremoso de boa qualidade, assim como qualquer queijo processado, deve apresentar-se com superfície brilhante, lisa e sem arenosidade. Os defeitos podem ser decorrentes do processamento inadequado, destacando-se homogeneização insuficiente, excesso ou falta de aquecimento, escolha e/ ou quantidade errada de sais emulsificantes (KOSIKOWSKY; MISTRY, 1997). Ainda, segundo Silva, Van Dender e Moreno (2003), as alterações causadas por microrganismos deteriorantes também ocupam importante participação nos defeitos do requeijão cremoso e, em especial, contribuem para reduzir a vida útil deste derivado lácteo.

Dentre os defeitos resultantes da adição incorreta de sais fundentes destacam-se o desenvolvimento de sabor amargo e a formação de cristais. O desenvolvimento de sabor amargo em queijos processados pode estar correlacionado com o tipo e quantidade de sal emulsificante adicionado. Meyer

(2001) em um estudo que avaliou o amargor de queijos processados na Áustria correlacionou a ocorrência deste defeito com o uso de sal fundente com alto teor de fósforo. A formação de cristais em queijos processados é um defeito resultante da adição dos sais fundentes à base de ortofosfatos e fosfatos de cálcio (KOSIKOWSKY; MITRY, 1997).

Quanto aos defeitos decorrentes da contaminação microbiana, a formação de gás é percebida poucas semanas após o envase e, normalmente, estão associadas ao desenvolvimento de microrganismos esporogênicos fermentadores de açúcar *Clostridium tyrobutiricum* e *Clostridium sporogenes* (KOSIKOWSKY; MITRY, 1997; MORENO; VIALTA; VALLE, 2002).

Ainda, como defeito correlacionado com mau processamento encontra-se o escurecimento não enzimático, que se caracteriza por um defeito de cor resultante da temperatura e /ou tempo excessivo de aquecimento da massa para a fusão (KOSIKOWSKY; MITRY, 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

O leite de vaca padronizado, homogeneizado e pasteurizado (150 L) e o creme de leite homogeneizado e pasteurizado (3,0 kg), ambos da marca Frimesa[®], foram parcialmente cedidos pela Cooperativa Central Agropecuária-Frimesa. O restante utilizado, assim como o leite em pó desnatado (Molico[®], Nestlé, São Paulo, Brasil) e o sal (Cisne[®], Rio Grande do Norte, Brasil) foram adquiridos no comércio local da cidade de Medianeira, PR.

O ácido láctico 85%, grau alimentício (Purac FCC 85), foi gentilmente cedido pela Purac Sínteses Indústria e Comércio Ltda[®].

A cultura láctica contendo o microrganismo probiótico (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) foi, inicialmente, gentilmente cedida pela empresa Chr Hansen[®]. A seguir, foi obtida de empresa especializada no ramo.

O prebiótico inulina (Beneo[™] GR) e oligofrutose (Beneo[™] P95), produzidos pela Orafiti[®], foram gentilmente cedidos pela empresa Clariant[®], representante brasileira deste produto.

O sal fundente foi gentilmente cedido pela Germinal Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda[®].

Os reagentes químicos que foram empregados nas análises de composição centesimal e propriedades físico-químicas apresentaram grau analítico, bem como os meios de cultura padrão microbiológico adequado.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Produção de requeijão cremoso

Revisão de literatura e testes preliminares foram realizados com o objetivo de determinar a formulação de requeijão cremoso que, além de atender aos padrões de identidade e qualidade preconizados pela legislação vigente (BRASIL, 1997), viesse a ser utilizada na elaboração de requeijão cremoso simbiótico.

Dessa forma, o fluxograma descrito na FIGURA 02 apresenta, de maneira simplificada, o processo selecionado de fabricação de requeijão cremoso processado com massa obtida por acidificação direta a quente, a ser utilizado na elaboração de requeijão cremoso probiótico, nos testes preliminares, empregando cerca de 50 L por teste (ao total de 300 L), e nas diferentes formulações do planejamento para elaboração de requeijão cremoso simbiótico, empregando-se cerca de 100 L em cada fabricação (para cada repetição, no total, 300 L).

O leite padronizado, homogeneizado e pasteurizado foi transferido para o tanque de fabricação de queijo, capacidade de 115 L (Biasinox[®] Ind. e Com. Ltda., Minas Gerais, Brasil), aquecido a 82°C e adicionado de 0,28% (v/v) de ácido láctico a 85%, grau alimentício, previamente diluído em água destilada na proporção de 1:10, sob agitação. A seguir, agitou-se o coágulo formado por três minutos e o mesmo permaneceu em repouso por dez minutos para finalizar a precipitação e firmar a massa (SILVA; VAN DENDER; MELLO, 2004). Decorrido o tempo, procedeu-se a dessoragem da massa à temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$).

Em seguida, a massa foi colocada em formas plásticas, dotadas de dessorador, e submetidas à prensagem final, a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), em prensas verticais, sob pressão proporcional a duas vezes o peso da massa, por um período de 20 minutos. Após isto, a massa foi retirada das formas, virada,

reenformada e novamente mantida sob pressão por 50 minutos com peso constante a, aproximadamente, duas vezes o da massa (RAPACCI, 1997).

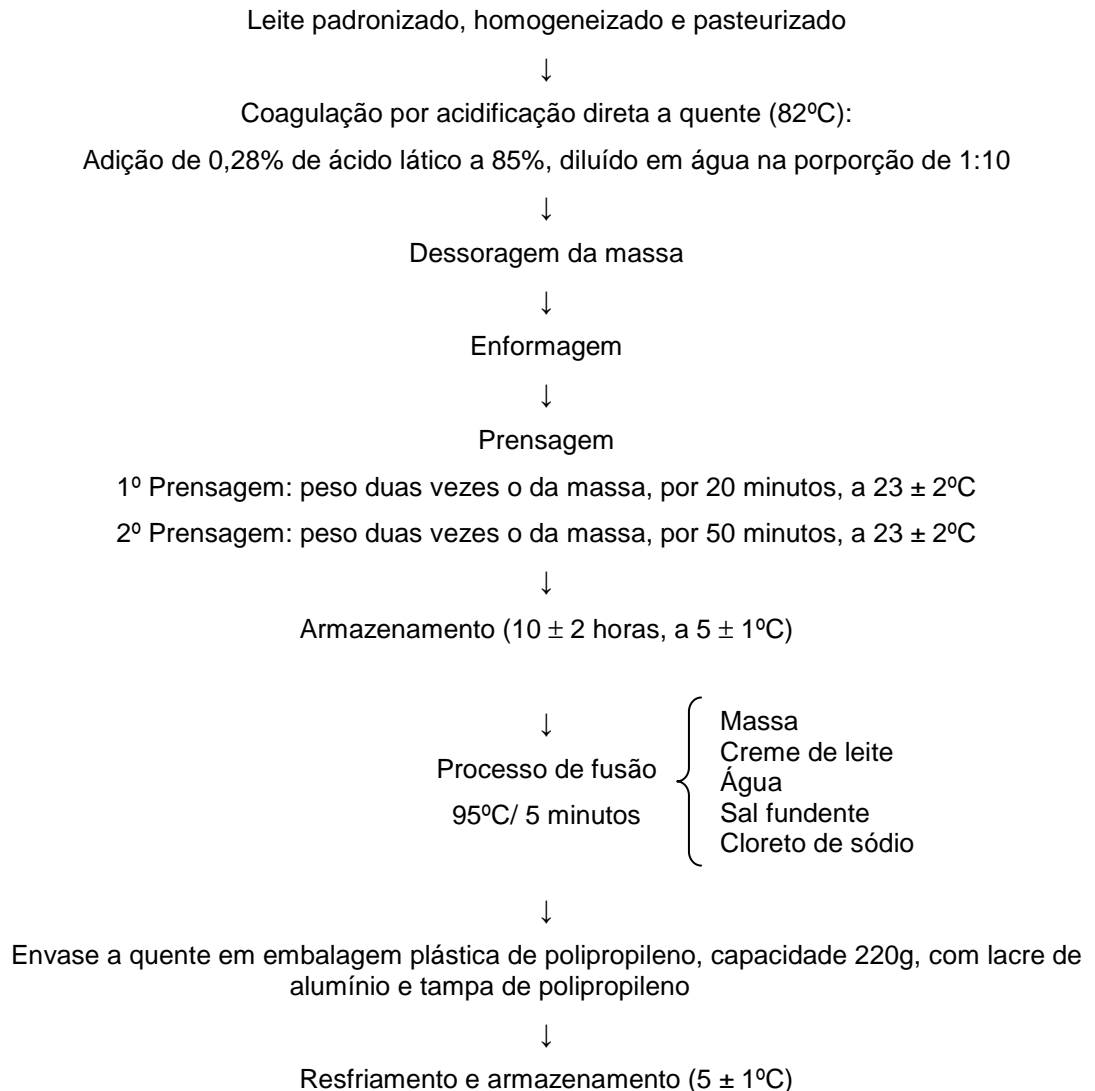


FIGURA 02 - FLUXOGRAMA GERAL DE ELABORAÇÃO DE REQUEIJÃO CREMOSO A PARTIR DE MASSA OBTIDA POR ACIDIFICAÇÃO DIRETA A QUENTE

FONTE: adaptado de RAPACCI (1997) e SILVA; VAN DENDER; MELLO (2004).

Ao terminar o tempo de prensagem, a massa obtida foi desenformada, acondicionada em recipientes plásticos cobertos com papel alumínio e mantida sob refrigeração por 10 ± 2 horas, em câmara de estocagem à temperatura de $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$, até ser utilizada na fabricação do requeijão cremoso.

A seguir, a massa foi pesada em balança semi-analítica digital, onde este valor serviu de base para o cálculo dos demais ingredientes a serem adicionados, e transferida para um tachó de aço inoxidável de camisa dupla (Biasinox[®] Ind. e Com. Ltda, Minas Gerais, Brasil), com aquecimento indireto a vapor, onde foram adicionados o cloreto de sódio na proporção de 1,3% (m/m), sal emulsificante na concentração de 2,5% (m/m), metade do peso do creme de leite e metade do volume de água, de acordo com o proposto por Meyer (1973) citado por Rapacci (1997).

Os cálculos das quantidades de creme de leite e de água visando obter concentração superior a 55% de gordura no extrato seco (GES) (mínimo exigido pela legislação brasileira) seguiram o proposto por Van Dender *et al.* (2006).

Posteriormente, a mistura foi homogeneizada a frio por dois minutos. Decorrido o tempo, foi iniciado o aquecimento necessário para o processo de fusão da massa, cujo tempo e temperatura foram de 95°C por cinco minutos, bem como a adição do restante dos ingredientes.

Para maior homogeneidade, o requeijão cremoso foi transferido do tachó para homogeneizador industrial (Metalúrgica Siemens[®], Santa Catarina, Brasil), onde foi submetido à homogeneização final por cerca de três minutos.

Atingida a consistência desejada, o requeijão foi embalado ainda quente, manualmente, em copos plásticos de polipropileno, capacidade 220g, devidamente higienizados em solução de hipoclorito de sódio 100 ppm, selado com lacre de alumínio com auxílio de seladora manual (Biasinox[®] Ind. e Com. Ltda, Minas Gerais, Brasil) e fechado com tampa plástica. O requeijão cremoso foi armazenado em câmara fria, à temperatura de $5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 60 dias. O tempo de vida útil foi determinado mediante média das vidas úteis dos requeijos cremosos comercializados no mercado.

3.2.2 Produção de requeijão cremoso simbiótico

3.2.2.1 Testes preliminares

3.2.2.1.1 Produção de requeijão cremoso probiótico

Antes de estudar o efeito dos prebióticos sobre o microrganismo probiótico (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12), testes preliminares foram realizados através de planejamentos experimentais para definição da concentração do inóculo a ser adicionado, que diferiram entre si quanto à forma (liofilizado ou pré-ativado em leite em pó desnatado e reconstituído - LPDR a 10%, previamente esterilizado a 121°C/ 15 minutos, e incubado por 07 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, resfriado a $8 \pm 1^\circ\text{C}$ e mantido nestas condições até o momento do uso – cerca de 15 horas) e temperatura de adição. Nestes planejamentos foram estudados a forma de adição e os efeitos das variáveis concentração e temperatura de adição sobre a resposta contagem de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, expresso em \log_{10} UFC/ g.

Para tal, o requeijão cremoso probiótico foi elaborado de acordo com o fluxograma descrito no item 3.2.1, modificado, apenas, devido à inserção do inóculo no final do processo de fusão da massa, quando a temperatura do produto fundido (cerca de 95°C) foi reduzida para as estudadas (50 a 70°C), adicionado das diferentes concentrações do microrganismo probiótico, determinadas pelo planejamento, submetido a uma nova homogeneização, envasado e acondicionado à temperatura de refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$). Em todos os testes, o procedimento de contagem do microrganismo probiótico foi realizado um dia após a fabricação das formulações (Tempo 0), de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.7.

O primeiro teste consistiu na elaboração de sete tratamentos de requeijão cremoso (T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7), variando em cada uma delas a quantidade de microrganismo probiótico, que neste caso foi adicionado liofilizado no final do processo de fusão na concentração indicada pelo fabricante (0,01 a 0,03 g/ 100 g de requeijão cremoso), e a temperatura de adição (50 a 70°C) inferior a de fusão (95°C), devido à sensibilidade térmica do probiótico. O delineamento do experimento foi um fatorial 2^2 completo, com três pontos centrais, conforme descrito na Tabela 01.

TABELA 01 - DELINEAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS, UTILIZADO NO DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM NÍVEIS CODIFICADOS E REAIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS (CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO LIOFILIZADO E TEMPERATURA)

TRATAMENTOS	CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO LIOFILIZADO (0,01 A 0,03 g/ 100 g DE REQUEIJÃO CREMOSO)	TEMPERATURA (50 A 70°C)
T1	-1 (0,01)	-1 (50)
T2	-1 (0,01)	+1 (70)
T3	+1 (0,03)	-1 (50)
T4	+1 (0,03)	+1 (70)
T5	0 (0,02)	0 (60)
T6	0 (0,02)	0 (60)
T7	0 (0,02)	0 (60)

FONTE: O autor (2009).

O segundo teste consistiu na elaboração de sete tratamentos de requeijão cremoso (T8, T9, T10, T11, T12, T13 e T14, respectivamente), diferindo do teste anterior pela concentração do inóculo empregada, que foi mais elevada e variou de 0,1 a 0,3 g/ 100 g de requeijão cremoso. As temperaturas avaliadas foram as mesmas anteriormente citadas. Também foi utilizado delineamento fatorial 2^2 completo, com três pontos centrais, conforme descrito na Tabela 02.

TABELA 02 - DELINEAMENTO FATORIAL COMPLETO 2², COM 3 PONTOS CENTRAIS, UTILIZADO NO DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM NÍVEIS CODIFICADOS E REAIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS (CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO LIOFILIZADO E TEMPERATURA)

TRATAMENTOS	CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO LIOFILIZADO (0,1 A 0,3 g/ 100 g DE REQUEIJÃO CREMOSO)	TEMPERATURA (50 A 70°C)
T8	-1 (0,1)	-1 (50)
T9	-1 (0,1)	+1 (70)
T10	+1 (0,3)	-1 (50)
T11	+1 (0,3)	+1 (70)
T12	0 (0,2)	0 (60)
T13	0 (0,2)	0 (60)
T14	0 (0,2)	0 (60)

FONTE: O autor (2009).

O terceiro teste consistiu na elaboração de mais sete tratamentos de requeijão cremoso (T15, T16, T17, T18, T19, T20 e T21, respectivamente), diferindo do teste anterior pela forma de adição do inóculo. Para tal, o microrganismo foi adicionado em uma solução de LPDR a 10% (m/ v) (Molico®, Nestlé, Brasil), de forma a obter concentração inicial do inóculo de 1% (m/ m), incubado a 37°C por 07 horas em estufa incubadora microprocessada para BOD (Alpax-, São Paulo, Brasil) e posteriormente refrigerada ($8 \pm 1^\circ\text{C}$) até o momento do uso (cerca de 15 horas). O produto resultante da fermentação foi utilizado como inóculo e denominado de “inóculo pré-ativado”. A concentração de inóculo utilizada foi de 9% (m/m) em relação ao produto final, de forma a obter no requeijão cremoso simbiótico contagem inicial mínima de $6 \log_{10}$ UFC/ g de produto, conforme indicação da literatura. Também foi utilizado delineamento fatorial 2² completo, com três pontos centrais, conforme descrito na Tabela 03.

TABELA 03 - DELINEAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS, UTILIZADO NO DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM NÍVEIS CODIFICADOS E REAIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS (CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO “PRÉ-ATIVADO” E TEMPERATURA)

TRATAMENTOS	CONCENTRAÇÃO DO “INÓCULO PRÉ-ATIVADO” (0,01 A 0,03 g/ 100 g DE REQUEIJÃO CREMOSO)	TEMPERATURA (50 A 70°C)
T15	-1 (0,1)	-1 (50)
T16	-1 (0,1)	+1 (70)
T17	+1 (0,3)	-1 (50)
T18	+1 (0,3)	+1 (70)
T19	0 (0,2)	0 (60)
T20	0 (0,2)	0 (60)
T21	0 (0,2)	0 (60)

FONTE: O autor (2009).

3.2.2.1.2 Produção de requeijão cremoso prebiótico

Testes preliminares visando avaliar a forma de adição dos ingredientes prebióticos foram realizados através de planejamento experimental. Para tanto, o requeijão cremoso prebiótico foi elaborado seguindo o delineamento *centroide simplex* tendo por metodologia base a proposta no fluxograma contido no item 3.2.1, diferindo no momento da adição de oligofrutose (Beneo™ P95) e/ ou inulina (Beneo™ GR), que se deu na concentração final de 5% (m/m) em relação ao peso do requeijão cremoso final (Tabela 04), durante o processo de fusão da massa.

TABELA 04 - DELINEAMENTO *CENTROIDE SIMPLEX* UTILIZADO NO DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CREMOSO PREBIÓTICO COM NÍVEIS CODIFICADOS E REAIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS

FORMULAÇÃO	INULINA (g/ 100 g)	OLIGOFRUTOSE (g/ 100 g)
F1	-1(0)	-1 (0)
F2	1 (5,0)	-1(0)
F3	-1 (0)	1 (5,0)
F4	½ (2,5)	½ (2,5)

FONTE: O autor (2009).

Neste caso, procurou-se avaliar o efeito da forma de adição sobre a resposta sensorial. Assim, os tratamentos foram submetidos à análise microbiológica, com o objetivo de verificar a segurança dos provadores, conforme item 3.2.9 e, posteriormente, submetidos à análise sensorial conforme item 3.2.10.2.

3.2.3 Produção de requeijão cremoso simbiótico

Com o objetivo de produzir requeijão cremoso simbiótico foram elaboradas 07 formulações de requeijão cremoso, de acordo com o delineamento fatorial completo 2^2 , com três pontos centrais, seguindo formulação previamente determinada pelos testes preliminares, onde todos os tratamentos foram adicionados do probiótico na forma de “inóculo pré-ativado”, na concentração de 9% (m/m) em relação ao produto final, à temperatura de 70°C, diferindo as formulações entre si, portanto, quanto ao tipo (inulina e oligofrutose) e concentração de prebiótico (0 a 7 g/ 100 g de requeijão cremoso) utilizados, conforme sumarizado na Tabela 05.

TABELA 05 - DELINEAMENTO FATORIAL COMPLETO 2², COM 3 PONTOS CENTRAIS, UTILIZADO NO DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM NÍVEIS CODIFICADOS E REAIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS (INULINA E OLIGOFRUTOSE)

FORMULAÇÃO	INULINA (g/ 100 g DE REQUEIJÃO)	OLIGOFRUTOSE (g/ 100 g DE REQUEIJÃO)
F1	-1 (0)	-1 (0)
F2	+1 (7)	-1 (0)
F3	-1 (0)	+1 (7)
F4	+1 (7)	+1 (7)
F5	0 (3,5)	0 (3,5)
F6	0 (3,5)	0 (3,5)
F7	0 (3,5)	0 (3,5)

FONTE: O autor (2009).

Paralelamente, foi elaborada uma formulação denominada de Formulação Controle, que não apresentava ingrediente prebiótico nem microrganismo probiótico, cuja elaboração seguiu a metodologia descrita no 3.2.1.

Nas formulações do planejamento foram avaliadas a composição centesimal e as propriedades físico-químicas das formulações, bem como se as variáveis estudadas, inulina e oligofrutose, na faixa de concentração empregada (0 a 7 g/ 100 g de requeijão cremoso), exerceriam efeito significativo sobre as respostas perfil de textura, contagem de bactérias probióticas e avaliação sensorial, respostas estas que têm importância na aceitabilidade do produto por parte do consumidor e no atendimento aos padrões previstos na legislação vigente para produtos probióticos. A Formulação Controle foi submetida às mesmas análises citadas, com exceção da contagem de bactérias probióticas, já que as mesmas não foram adicionadas destes.

3.2.4 Análise da composição centesimal e das propriedades físico-químicas

3.2.4.1 Procedimentos de amostragem

O procedimento de preparo das amostras foi realizado segundo as metodologias descritas na Instrução Normativa n. 68 (BRASIL, 2006) e na AOAC (2000).

O leite padronizado, homogeneizado e pasteurizado foi homogeneizado à temperatura de 15 a 20°C. Quando apresentou grumos de creme, foi aquecido a 38 - 40°C em banho-maria e posteriormente resfriado até 15 a 20°C, agitando ocasionalmente. Procedimento similar foi adotado para o soro ácido.

O creme de leite foi homogeneizado com bastão de vidro até formação de uma emulsão homogênea e, quando necessário, aquecido até 55°C em banho-maria durante 10 minutos, e imediatamente analisado.

A massa foi triturada em processador, homogeneizada e acondicionada em frasco de boca larga com tampa, conservado a temperatura de refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$).

O requeijão foi homogeneizado em gral, acondicionado em frasco de boca larga com tampa e conservado a temperatura de refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$).

3.2.4.2 Análise das matérias-primas e do soro ácido

As análises da composição centesimal e propriedades físico-químicas do leite padronizado, homogeneizado e pasteurizado; creme de leite e massa

empregados na elaboração das diferentes formulações de requeijão cremoso do planejamento e Controle, bem como do soro obtido na fabricação da massa de queijo para elaboração do requeijão cremoso, foram realizadas de acordo com métodos oficiais definidos.

3.2.4.2.1 Lipídios

O leite de vaca padronizado, homogeneizado e pasteurizado e o soro foram submetidos à análise de lipídios, pelo método butirométrico para leite fluido (BRASIL, 2006). Ao butirômetro de leite, contendo 10 mL de ácido sulfúrico, $d = 1,820-1,825$, foi adicionado 11 mL de amostra (leite ou soro) e 1 mL de álcool isoamílico, tampado com rolha de borracha e centrifugado (Instrumentos para Laboratório T.R. Ltda, Esteio, Rio Grande do Sul) durante 5 minutos de 1000 a 1200 rpm. Posteriormente, foi transferido para banho-maria a 65°C por 5 minutos e as operações de centrifugação e de incubação repetidas. A determinação do teor de lipídios, em percentagem, foi feita diretamente pela leitura no butirômetro.

O teor de lipídios em creme de leite foi determinado através do método butirométrico para leite desidratado e creme de leite pelo butirômetro de leite (BRASIL, 2006). Foi pesado, em balança analítica com precisão de ± 1 mg, exatamente, 1 g de amostra homogeneizada em um béquer de 50 mL, adicionado 10 mL da solução de ácido sulfúrico, densidade 1,605, e aquecido a 60°C, sob homogeneização constante. A seguir, foi transferido quantitativamente para um butirômetro de leite, efetuando 2 ou 3 lavagens do béquer com 3 a 4 mL da solução de ácido sulfúrico, de forma a completar 19 mL. Ao final, foi adicionado 1 mL de álcool isoamílico, tampado com rolha apropriada, agitado e levado ao banho-maria a 65°C por 15 minutos. Findo o tempo, foi centrifugado por 15 minutos a 1200 rpm (Instrumentos para Laboratório T.R. Ltda, Esteio, Rio Grande do Sul). As operações de banho-maria e centrifugação foram repetidas mais 2 vezes e a leitura realizada

na escala do butirômetro. O valor lido no butirômetro foi colado na Equação 01 para obtenção do teor de lipídios.

$$\text{Lipídios (\% m/m)} = \frac{L}{m} \times 11,33 \quad (\text{Equação 01})$$

onde:

L = leitura no butirômetro;

11,33 = massa em gramas do leite;

m = massa da amostra, em gramas.

O teor de lipídios da massa foi determinado através do método butirométrico para queijo (BRASIL, 2006). Foi pesado, em balança analítica com precisão de ± 1 mg, exatamente, 3 g da amostra previamente preparada diretamente no copo do butirômetro e este acoplado à parte inferior do butirômetro. Em seguida, foi adicionado cerca de 5 mL de água, 10 mL da solução de ácido sulfúrico e 1 mL de álcool isoamílico. O butirômetro, tampado com a rolha, foi colocado em banho-maria a 65°C e posteriormente agitado, repetindo estas etapas (aquecimento e agitação) até completa dissolução da amostra. Quando a amostra estava completamente dissolvida, foi retirada a tampa superior do butirômetro e adicionado água até a última marcação deste. Após enxugar a borda do butirômetro com papel absorvente, foi recolocada a tampa e centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm (Instrumentos para Laboratório T.R. Ltda, Esteio, Rio Grande do Sul). A leitura da porcentagem de gordura foi feita diretamente na escala do butirômetro. Quando necessário, foi repetido as operações de aquecimento e centrifugação, e efetuada nova leitura.

3.2.4.2.2 Proteína

O teor de proteínas do leite padronizado, homogeneizado e pasteurizado, creme de leite, massa e soro foi determinado segundo metodologia descrita em BRASIL (2006). Aproximadamente, 0,5 g de amostra, pesada em balança analítica

com precisão de ± 1 mg, foram digeridas em balão de micro Kjeldahl com 2,5 g de mistura catalítica (10 K₂ SO₄ PA:1 CuSO₄.5 H₂O PA) e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. O creme de leite foi adicionado, ainda, de 1,0 g de antiespumante (silicone). A solução digerida foi destilada em equipamento de destilador de nitrogênio (Tecnal®, São Paulo, Brasil), após neutralização com solução de NaOH a 50% (cerca de 30 mL), para a liberação da amônia, sendo esta recolhida em uma solução de ácido bórico a 4%. A solução obtida foi titulada com solução padrão de HCl 0,1N. O teor de proteínas foi calculado multiplicando o valor de nitrogênio total obtido pelo fator de conversão 6,38.

3.2.4.2.3 Carboidratos

O teor de carboidratos foi determinado por diferença através da equação 02 (ASCAR, 1985).

$$\text{Carboidratos (\%m/m)} = 100 - (\% \text{umidade} + \% \text{proteína} + \% \text{lipídios} + \% \text{cinzas})$$

Equação 02

3.2.4.2.4 Extrato seco total

O método de determinação de extrato seco total para as matérias-primas e soro foi o método de gravimetria em estufa a $102 \pm 2^\circ\text{C}$ (BRASIL, 2006). Cerca de 3 g da amostra, pesada em balança analítica com precisão de ± 1 mg, devidamente preparada, foi pesada em uma cápsula contendo aproximadamente 25 g de areia, com tampa e bastão sobre a tampa, previamente submetidos à estufa de secagem a $102 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 1 hora e resfriados em dessecador até temperatura ambiente. A

amostra foi completamente misturada com a areia e o conjunto todo (cápsula, bastão, areia misturada com a amostra e a tampa) submetido à secagem em estufa a $102 \pm 1^\circ\text{C}$ até peso constante (cerca de 06 horas). A determinação dos sólidos totais foi realizada por gravimetria.

3.2.4.2.5 Extrato seco desengordurado

O teor de extrato seco desengordurado (ESD) das matérias-primas foi determinado segundo metodologia 990.21 da AOAC (2000), utilizando a equação 03.

$$\text{Extrato seco desengordurado (\% m/m)} = \% \text{ extrato seco total} - \% \text{ gordura} \quad (\text{Equação 03})$$

3.2.4.2.6 Cinzas

Cerca de 5 g de amostra foram pesadas, em balança analítica com precisão de ± 1 mg, em cadinho de porcelana, previamente submetido à temperatura de 550°C em forno mufla elétrico por 01 hora e resfriado em dessecador até temperatura ambiente, transferidos para forno mufla a 550°C até que as cinzas se tornem brancas (cerca de 07 horas). Após o resfriamento em dessecador, as cinzas foram determinadas gravimetricamente (AOAC, 2000, 945.46)

3.2.4.2.7 pH

O pH do leite padronizado, homogeneizado e pasteurizado, do creme de leite e do soro foi determinado através do método eletroanalítico, colocando cerca de 50 mL de amostra em um béquer, utilizando pHmetro modelo CG 818 (Schott Geräte®, Mainz, Germany) (PEREIRA *et al.*, 2001).

O pH da massa foi determinado através do método eletroanalítico mediante adição sobre 20 mL de água de amostra previamente preparada em quantidade suficiente para obter uma massa homogênea, utilizando pHmetro modelo CG 818 (Schott Geräte®, Mainz, Germany) (BRASIL, 2006).

3.2.4.2.8 Acidez titulável, expressa em percentagem de ácido láctico

Para determinação da acidez titulável de leite e soro de leite, foram transferidos 20 mL de amostra para erlenmeyer de 125 mL, adicionados de 40 mL de água livre de gás carbônico, seguido por titulação de neutralização, utilizando solução padrão de NaOH 0,1M e fenolftaleína como indicador, de acordo com a metodologia 947.05 da AOAC (2000).

Para creme de leite, foram pesadas cerca de 10 g de amostra, em balança analítica com precisão de ± 1 mg, adicionados 50 mL de água isenta de gás carbônico (CO₂) e homogeneizado, seguido por titulação de neutralização com solução padrão de NaOH 0,1N e fenolftaleína como indicador (BRASIL, 2006).

Para a massa, foi transferida 10 g da amostra, pesadas em balança analítica com precisão de ± 1 mg, a para um béquer de 150 mL, acrescentado de cerca de 50 mL de água morna isenta de gás carbônico (CO₂) (40°C) e agitado com bastão de vidro até dissolução possível. A seguir, transferido quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL, esfriado em água corrente e completado o volume. Foi

transferido uma alíquota de 50 mL para um béquer de 150 mL e esta submetida à titulação de neutralização com padrão de NaOH 0,1M e fenolftaleína como indicador (AOAC, 2000, 920.124).

3.2.4.2.9 Densidade a 15°C

A densidade do leite foi realizada em 500 mL de leite colocados em uma proveta com auxílio de um termolactodensímetro a 15°C (BRASIL, 2006).

3.2.4.2.10 Crioscopia

Cerca de 3 mL de leite padronizado, homogeneizado e pasteurizado foram transferidos para um tubo de vidro e a leitura da crioscopia (ponto de congelamento do leite) realizada em crioscópio microprocessável auto-calibrável (Laktron[®], Londrina, Paraná) segundo metodologia 990.22 da AOAC (2000).

3.2.4.3 Análise das formulações de requeijão cremoso simbiótico e da Formulação Controle

As diferentes formulações de requeijão cremoso simbiótico do planejamento e da Formulação Controle foram submetidas às análises de composição centesimal e propriedades físico-químicas seguindo metodologias específicas.

3.2.4.3.1 Lipídios

O teor de lipídios foi determinado através do método butirométrico para queijo (BRASIL, 2006), descrito no item 3.2.4.2.1.

3.2.4.3.2 Proteína

O teor de proteína foi determinado segundo a metodologia descrita em BRASIL (2006). Aproximadamente, 0,5 g de amostra, pesadas em balança analítica com precisão de ± 1 mg, foram digeridas em balão de micro Kjeldahl com 2,5 g de mistura catalítica (10 K₂ SO₄ PA:1 CuSO₄.5 H₂O PA), 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1,0 g de antiespumante (silicone). A solução digerida foi destilada em equipamento de destilador de nitrogênio (Tecnal[®], São Paulo, Brasil), após neutralização com solução de NaOH a 50% (cerca de 30 mL), para a liberação da amônia, sendo esta recolhida em uma solução de ácido bórico a 4%. A solução obtida foi titulada com solução padrão de HCl 0,1N. O teor de proteínas foi calculado multiplicando o valor de nitrogênio total obtido pelo fator de conversão 6,38.

3.2.4.3.3 Umidade e voláteis e extrato seco total

O método de determinação de umidade e voláteis e extrato seco total foi o método de gravimetria em estufa a $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (BRASIL, 2006). Cerca de 3 g da amostra, pesadas em balança analítica com precisão de ± 1 mg, devidamente preparada, foi pesada em uma cápsula contendo aproximadamente 25 g de areia,

com tampa e bastão sobre a tampa, previamente submetidos à estufa de secagem a $102 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 1 hora e resfriados em dessecador até temperatura ambiente. A amostra foi completamente misturada com a areia e o conjunto todo (cápsula, bastão, areia misturada com a amostra e a tampa) submetido à secagem em estufa a $102 \pm 1^\circ\text{C}$ até peso constante (cerca de 06 horas). A determinação dos sólidos totais foi realizada por gravimetria. A determinação de umidade e voláteis foi realizada de acordo com a equação abaixo (Equação 04).

$$\%U \text{ (m/ m)} = 100 - \% \text{ Sólidos totais} \quad (\text{Equação 04})$$

onde:

% U = percentagem de umidade

3.2.4.3.4 Cinzas

Cerca de 5 g de amostra foram pesadas, em balança analítica com precisão de ± 1 mg, em cadinho de porcelana, previamente submetido à temperatura de 550°C em forno mufla elétrico por 01 hora e resfriado em dessecador até temperatura ambiente, transferidos para forno mufla a 550°C até que as cinzas se tornarem brancas (cerca de 07 horas). Após o resfriamento em dessecador, as cinzas foram determinadas gravimetricamente (AOAC, 2000, 935.42).

3.2.4.3.5 Cloreto de sódio

Partindo dos resíduos obtidos em cinzas, foi empregado o método argentométrico (BRASIL, 2006).

3.2.4.3.6 Gordura no extrato seco

O teor de gordura no extrato seco (GES) foi determinado segundo fórmula (Equação 05) proposta por Furtado (1990).

$$\% \text{GES (m/ m)} = \frac{\%G}{\%EST} \times 100 \quad (\text{Equação 05})$$

onde:

% GES = percentagem de gordura no extrato seco

% G = percentagem de gordura

% EST = percentagem de extrato seco total

3.2.4.3.7 pH

Foi utilizado o método eletroanalítico empregado na determinação do pH da massa, conforme descrito no item 3.2.4.2.7.

3.2.4.3.8 Acidez titulável, expressa em percentagem de ácido láctico

A análise foi realizada de acordo com o descrito no item 3.2.4.2.8 para a massa.

3.2.5 Avaliação do perfil de textura

As características texturais medidas para o produto final foram: firmeza, adesividade, coesividade, elasticidade e gomosidade. Para isso, as formulações do planejamento e a Formulação Controle foram mantidas no interior da embalagem, em câmara de refrigeração ($5 \pm 1^\circ \text{C}$), onde foram coletadas amostras no 3º dia (tempo inicial) e ao final dos 60 dias de armazenamento (tempo final) até a realização das análises. As análises foram realizadas no requeijão dentro da própria embalagem. Para isso, foi utilizado analisador de textura TA.XT2i (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY), com o software *XTRAD Texture Expert* para a análise de dados. O probe utilizado foi o de acrílico cilíndrico P25. A velocidade pré-teste, teste e pós-teste foi de 5,0 mm/s com penetração de 20 mm no requeijão. Foram realizadas três repetições para cada formulação do planejamento e para a Formulação Controle.

A firmeza pode ser definida como a força necessária para ocasionar uma compressão no alimento e é expressa em Newton (N). A adesividade é definida como a força necessária para vencer as forças de atração entre a superfície do alimento e a superfície do elemento de prova, sendo expressa como N.s (Newton por segundo). A elasticidade é dada como a altura que o alimento recupera entre o primeiro e o segundo ciclo de compressão. A coesividade é a relação entre a área da força obtida durante o segundo ciclo de compressão e a área da força obtida no primeiro ciclo de compressão. Tanto a elasticidade quanto a coesividade são adimensionais. A gomosidade é obtida mediante a multiplicação da firmeza pela coesividade e, neste caso, é expressa em N.

3.2.6 Quantificação dos prebióticos

A quantificação de inulina e oligofrutose foi realizada de acordo com o método enzimático e espectrofotométrico (FIGURA 03) desenvolvido por Steegmans, Ilaens e Hoebregs (2004), onde amostras das formulações contendo o prebiótico (F2, F3, F4, F5, F6 e F7) foram retiradas nos tempos T0 (01 dia após a fabricação) e T4 (60 dias após a fabricação) e submetidas à análise. Não foram realizadas análises nas formulações Controle e F1, pois não foram adicionadas das fibras prebióticas.

As concentrações de glicose no A₀ e de frutose nas A₀, A₁ e A₂ foram calculadas de acordo com o manual do *kit* utilizado na determinação (*Boehringer, R-Biopharm GmbH, Darmstad, Germany*). O teor de inulina e de oligofrutose foram calculados utilizando as Equações 06 e 07:

$$F_i = (F_t) \text{ do } A_2 - (F_f + F_s) \text{ do } A_1 \quad \text{Equação 06}$$

onde:

F_i = frutose de inulina/ oligofrutose

F_t = frutose total

F_f = frutose livre

F_s = frutose da sacarose

$$\text{Inulina/oligofrutose (g/ 100 g)} = i = k \times F_i \quad \text{Equação 07}$$

onde:

K = fator (calculado de acordo com a inulina/ oligofrutose empregada e para amostras desconhecidas 0,995)

F_i = frutose de inulina/ oligofrutose

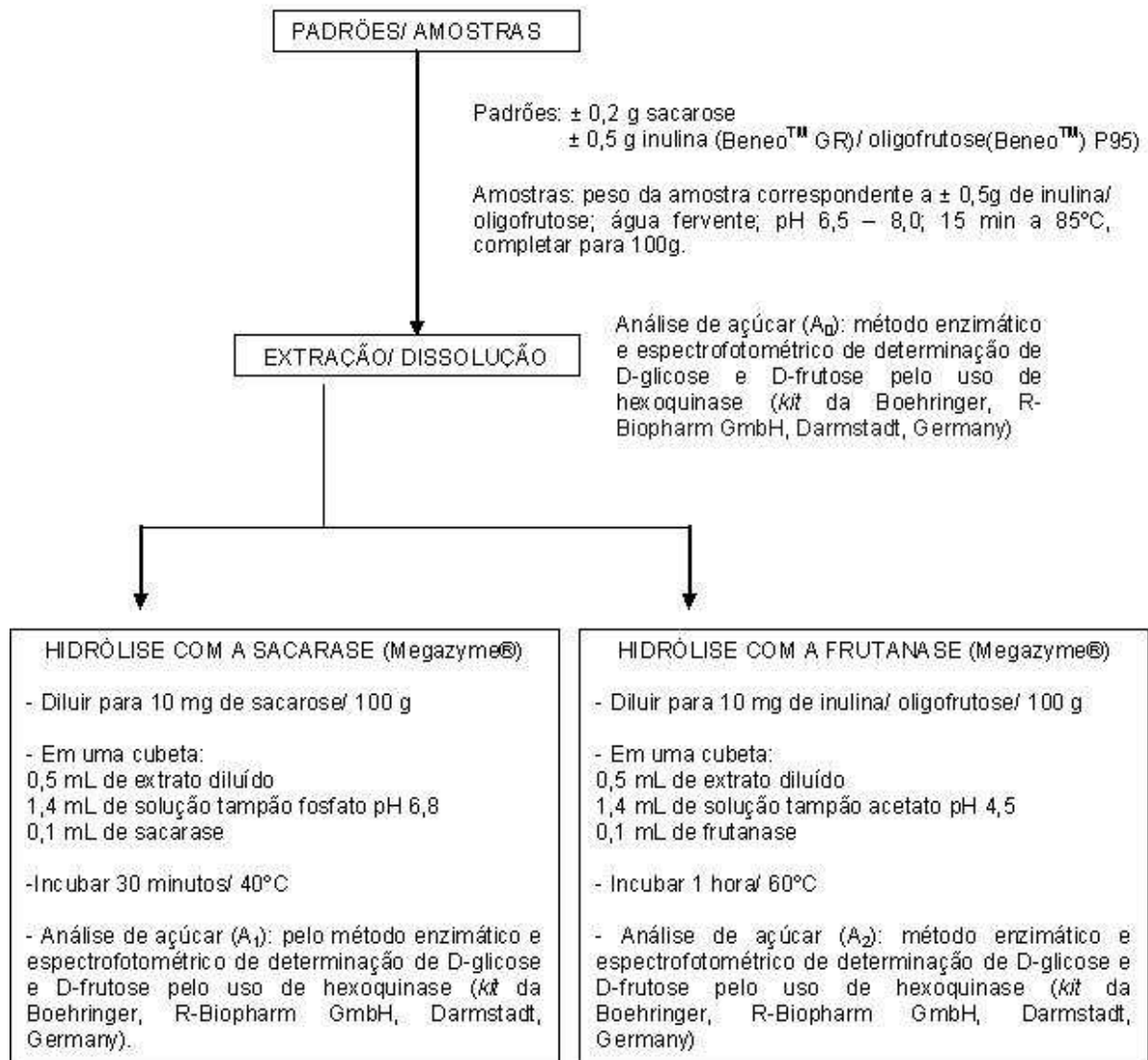


FIGURA 03 - FLUXOGRAMA DO MÉTODO ENZIMÁTICO/ ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE INULINA/ OLIGOFRUTOSE

FONTE: STEEGMANS; ILIAENS; HOEBREGS (2004)

3.2.7 Contagem das bactérias probióticas

Com o objetivo de verificar se a adição do probiótico atingiu a concentração mínima de $6 \log_{10}$ UFC/ g de produto, bem como a viabilidade do requeijão cremoso como carreador deste microrganismo, os tratamentos foram submetidos à análise microbiológica de contagem de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. Assim, 25 g de cada amostra, pesadas assepticamente em balança localizada em capela de fluxo laminar, contendo microrganismo probiótico nos períodos 1 (Tempo 0), 15 (Tempo 01), 30 (Tempo 02), 45 (Tempo 03) e 60 (Tempo 04) dias, foram diluídas em 225 mL de solução de água peptonada 0,1%, submetidas à homogeneização, empregando homogeneizador de amostras tipo *Stomacher* (Logen Scientific®), por cerca de 6 minutos, de modo a obter diluição 10^{-1} ; a partir desta foram realizadas as demais diluições até 10^{-6} . Posteriormente, as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram plaqueadas, em meio MRS, modificado pela adição de 0,2% de cloreto de lítio e 0,3% de propionato de sódio (MRS-LP), pelo método de inoculação em profundidade, empregando dupla camada, incubadas sob anaerobiose pelo emprego de *sachet* de anaerobiose (PROBAC®, São Paulo, Brasil) e jarra de anaerobiose a 37°C por 03 dias, em BOD (Alpax®, São Paulo, Brasil), de acordo com Vinderola *et al.* (2000a).

3.2.8 Análise de pH e de acidez titulável, expressa em percentagem de ácido láctico, durante a vida útil de requeijão cremoso simbiótico

Foram realizadas análises de pH (BRASIL, 2006) e de acidez titulável, expressa em % de ácido láctico (AOAC, 2000, 920.124) nas amostras coletadas nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4, visando avaliar a vida útil do produto, de acordo com as metodologias descritas nos itens 3.2.4.3.7 e 3.2.4.3.8, respectivamente.

3.2.9 Análises microbiológicas

3.2.9.1 Procedimentos de amostragem

O procedimento de amostragem para a preparação dos materiais a serem utilizados nas análises microbiológicas seguiu o proposto na Instrução Normativa n. 62 (BRASIL, 2003).

3.2.9.2 Análises microbiológicas

Com o objetivo de verificar a segurança microbiológica das formulações de requeijão cremoso controle e do planejamento experimental foram realizadas as análises de coliformes a 35°C e 45°C e estafilococco coagulase positiva (BRASIL, 2001), seguindo metodologia proposta por Compendium... (1984) e Lanara (1981), respectivamente, 01 dia (Tempo 0) após a fabricação dos requeijões.

3.2.10 Avaliação sensorial

3.2.10.1 Equipe dos provadores, condicionamento dos tratamentos e local do teste

Foram recrutados verbalmente julgadores não treinados, de ambos os sexos, caracterizados por serem funcionários e alunos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná-Campus de Medianeira. Para tal, foram selecionados aqueles que apresentaram familiaridade com o produto (requeijão cremoso) e disponibilidade de tempo para a realização da análise, e que no momento da análise apresentavam-se em perfeito estado de saúde.

De acordo com o delineamento experimental, os tratamentos foram avaliados 07 dias após a fabricação no laboratório de Análise Sensorial, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná-Campus Medianeira, em cabines individuais, iluminadas com luz branca fluorescente. O delineamento em blocos incompletos foi aplicado neste estudo ($t = 8$, $k = 2$, $r = 7$ e $b = 28$). Por este procedimento, os 8 tratamentos ($t = 8$) foram divididos em 28 blocos e cada tratamento foi apresentado em 7 blocos ($r = 7$) (SILVA; DAMÁSIO, 1994). Cada provador recebeu os diferentes tratamentos (em número de 02) simultaneamente em copos plásticos descartáveis (cerca de 20 g), à temperatura de $15 \pm 2^{\circ}\text{C}$, devidamente codificados com números de três dígitos aleatórios (TEIXEIRA; MEINERT; BARBETA, 1987). Ao total, foram realizadas 84 análises. Foi instruído aos provadores utilizarem espátula de plástico descartável para avaliar o manuseio do produto, bem como a utilização de bolacha água e sal e água mineral entre as amostras para limpeza do palato. Simultaneamente, foi fornecida uma ficha de avaliação (Apêndice), que além da Escala Hedônica Estruturada de 09 pontos apresentava questões de análise de mercado.

3.2.10.2 Avaliação da aceitabilidade de requeijão cremoso

Para avaliação da aceitabilidade das diferentes formulações de requeijão cremoso avaliadas neste trabalho em relação aos atributos manuseio - de acordo com Garruti *et al.* (2003), manuseio corresponde a retirada do copo e o espalhamento sobre a bolacha água e sal, aroma, sabor, aparência e avaliação global foi empregado o método de Escala Hedônica estruturada de 09 pontos, onde 01 correspondeu a “desgostei muitíssimo” e 09 a “gostei muitíssimo” (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999). A avaliação do índice de aceitabilidade para o atributo impressão global foi calculado de acordo com Monteiro (1984).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos testes preliminares para determinar a concentração e a temperatura de adição do inóculo foram submetidos à análise de variância e, quando detectado diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de 5% de significância, ao Teste de Tukey *studentized*. Para avaliar o efeito das variáveis (concentração do inóculo e temperatura de adição) sobre a resposta enumeração de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 foi realizada a análise de efeitos. Nos casos em que as variáveis estudadas apresentaram efeitos significativos ao nível de 5% de significância, foi calculado a ANOVA e construída a superfície de resposta. Para estas análises, o programa estatístico utilizado foi o programa *Statistica*, versão 7.0.

Os resultados obtidos para composição centesimal e propriedades físico-químicas das formulações do planejamento foram submetidas à análise de variância e, quando detectada diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade, ao Teste de Tukey *studentized*, utilizando o programa estatístico *Statistica*, versão 7.0.

Os resultados obtidos para perfil de textura, enumeração de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e análise sensorial foram submetidos à análise de variância e quando detectada diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade foi aplicado o Teste de Tukey *studentized*. Para avaliar o efeito das variáveis (inulina e oligofrutose) sobre as respostas foi realizada a análise de efeitos. Nos casos em que as variáveis estudadas apresentaram efeitos significativos ao nível de 5% e 10% de significância, foi calculada a ANOVA e construída a superfície de resposta. Para estas análises, o programa estatístico utilizado foi o programa *Statistica*, versão 7.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TESTES PRELIMINARES

4.1.1 Produção de requeijão cremoso

Após revisão de literatura e testes preliminares, optou-se por elaborar o produto a partir de massa obtida por coagulação ácida, devido à praticidade desta técnica quando comparada com a massa obtida por fermentação láctica, adicionado de fermento acidificante *Lactococcus lactis* subps. *lactis* e *Lactococcus lactis* subps. *cremoris* (RAPACCI, 1997), bem como pela qualidade sensorial do produto final que, em alguns atributos como sabor e impressão global, apresentam-se melhores do que os requeijões cremosos elaborados a partir de massa produzida pela coagulação enzimática e ácida do leite (GOTELIP; JARDIM; MIGUEL, 2005). A formulação encontra-se descrita na Tabela 06.

TABELA 06 - FORMULAÇÃO PADRÃO PARA A ELABORAÇÃO DE REQUEIJÃO CREMOSO

INGREDIENTES	CONCENTRAÇÃO (% M/M)
Massa para fusão	49
Cloreto de sódio	0,6
Sal fundente	1,4
Creme de leite	29
Água	20

FONTE: O autor (2009).

4.1.2 Produção de requeijão cremoso probiótico

A escolha do microrganismo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 deve-se ao fato de que o mesmo apresenta propriedades fisiológicas bem documentadas (SHAH, 2007), destacando-se a capacidade de prevenir a diarreia dos viajantes; tratamento de diarreias virais, dentre elas rotavírus; modulação da microbiota intestinal; redução da constipação; modulação da resposta imune e redução dos sintomas de dermatite atópica em crianças (SAARELA *et al.*, 2000) assim como por ser destituído de toxicidade (MEILLE; LE BLAY; THIERRY, 2008) e por ser considerado dentre as demais espécies de *Bifidobacterium* resistente ao calor e moderadamente resistente ao oxigênio (SIMPSON *et al.*, 2005). Mc Brearty *et al.* (2001) ressaltam as características de robustez, a habilidade em utilizar a lactose, a baixa sensibilidade ao oxigênio e/ ou tolerância ao sal como os fatores que poderiam justificar a utilização deste probiótico na elaboração de queijo Cheddar.

Apesar de alguns autores reforçarem a idéia de que a produção de um queijo com propriedades probióticas não poderia utilizar metodologias diferenciadas daquelas empregadas tradicionalmente (Mc BREARTY *et al.*, 2001), mas nem sempre isso é possível e, por vezes, a modificação da tecnologia de fabricação é necessária (BOYLSTON *et al.*, 2004). Para poder elaborar requeijão cremoso probiótico e, subsequentemente, simbiótico, foi necessário optar por modificação no procedimento de elaboração. Logo, optou-se por adicioná-lo após a fusão da massa e demais ingredientes, em uma temperatura inferior a 95°C, mas que ainda permitisse facilidade de trabalho, daí a seleção das temperaturas na faixa de 50° a 70°C. Corbo *et al.* (2001) para poderem desenvolver queijo *Canastrado Pugliesi*, um queijo semi-duro de amplo consumo na Itália, adicionado de bifidobactéria, tiveram, também, que modificar a metodologia de fabricação tradicional deste queijo, que utilizava temperatura de 80°C por 30 segundos no cozimento da massa em soro para 50°C por dois minutos.

A matriz do ensaio realizada com os valores codificados e reais das variáveis estudadas (concentração e temperatura) e resposta (enumeração de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, expressa em \log_{10} UFC/g), quanto da adição da cultura liofilizada diretamente na massa após a fusão, está descrita na Tabela 07.

TABELA 07 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS) COM A RESPOSTA ENUMERAÇÃO DE *BIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB-12 (\log_{10} UFC/ G) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM ADIÇÃO DIRETA DO INÓCULO LIOFILIZADO

TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO (0,01 A 0,03 g/ 100 g DE REQUEIJÃO CREMOSO)	TEMPERATURA (50 A 70°C)	<i>B. ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (\log_{10} UFC/G)
T1	-1 (0,01)	-1 (50)	0
T2	-1 (0,01)	+1 (70)	0
T3	+1 (0,03)	-1 (50)	0
T4	+1 (0,03)	+1 (70)	0
T5	0 (0,02)	0 (60)	0
T6	0 (0,02)	0 (60)	0
T7	0 (0,02)	0 (60)	0

FONTE: O autor (2009).

No momento da realização dos testes preliminares não havia legislação brasileira que determinasse o número de microrganismos probióticos que alimentos deveriam apresentar para receberem alegação de propriedade funcional. Desta forma, optou-se, com base na literatura (DAVE; SHAH, 1997; SHAH; LANKAPUTHRA, 1997), que o mínimo de microrganismos probióticos apresentados pelos tratamentos deveria ser de $6 \log_{10}$ UFC/ g no produto. Desta forma, pode-se verificar que os resultados obtidos na Tabela 07 indicaram que a concentração empregada na elaboração do requeijão cremoso probiótico foi insuficiente para se

obter valores de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 recomendados pela literatura.

Assim, optou-se por aumentar em 1 \log_{10} a concentração de inóculo, obtendo alguns tratamentos com concentrações dentro da faixa esperada, conforme a matriz do ensaio descrita na Tabela 08.

TABELA 08 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2², COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS) COM A RESPOSTA ENUMERAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB-12 (LOG 10 UFC/ G) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM ADIÇÃO DIRETA DO INÓCULO LIOFILIZADO

TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO (0,1 A 0,3 g/ 100 g DE REQUEIJÃO CREMOSO)	TEMPERATURA (50 A 70°C)	<i>B. ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (LOG10 UFC/G)
T8	-1 (0,1)	-1 (50)	6,5 ^{a(1)}
T9	-1 (0,1)	+1 (70)	3,7 ^b
T10	+1 (0,3)	-1 (50)	6,7 ^a
T11	+1 (0,3)	+1 (70)	4,8 ^c
T12	0 (0,2)	0 (60)	4,8 ^c
T13	0 (0,2)	0 (60)	5,0 ^{cd}
T14	0 (0,2)	0 (60)	5,2 ^d

FONTE: O autor (2009).

NOTA: ⁽¹⁾ Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação aos resultados na Tabela 09, verifica-se que houve diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$), onde os tratamentos T8 e T10 apresentaram o maior número de microrganismos probióticos viáveis ($p \leq 0,05$), enquanto que o tratamento T9, o menor número ($p \leq 0,05$). Apesar dos tratamentos 11, 12, 13 e 14 terem apresentado concentrações intermediárias, assim como o T9, não atingiram o mínimo necessário para cumprir os valores preconizados pela literatura consultada.

Analisando-se os resultados da Tabela 08 foi possível calcular os efeitos das duas variáveis estudadas (concentração do inóculo e temperatura) sobre a resposta de enumeração de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (\log_{10} UFC/ g), apresentados na Tabela 09.

TABELA 09 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA A RESPOSTA ENUMERAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB-12 (LOG10 UFC/ G) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM ADIÇÃO DIRETA DO INÓCULO LIOFILIZADO

	EFEITO	ERRO PADRÃO	T (3)	P - VALOR
MÉDIA	5,1	0,1	57,2	0,0003*
CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO	1,2	0,2	6,7	0,0216*
TEMPERATURA	-1,8	0,2	-9,9	0,0010*
CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO X TEMPERATURA	-0,1	0,2	-0,5	0,6452

FONTE: O autor (2009).

NOTA: * $p \leq 0,05$.

Devido ao fato de que os efeitos, concentração de inóculo e temperatura, foram significativos sobre a resposta estudada (contagem de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12), foi calculado a ANOVA, cujos os resultados estão descritos na Tabela 10.

TABELA 10 - ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA A RESPOSTA ENUMERAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB-12 (LOG 10 UFC/ G) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM ADIÇÃO DIRETA DO INÓCULO LIOFILIZADO

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F _{CALCULADO}
Regressão	6,4	3,0	2,2	80,7
Resíduos	0,1	3,0	0,0	
Total	6,5	6,0		

FONTE: O autor (2009).

NOTA: $F_{3;3;0,05} = 9,27$ ^a = soma de quadrado ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

Observando os resultados para análise de variância (Tabela 10), como $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} foi possível construir a superfície de resposta da FIGURA 04.

Os resultados da análise de efeitos (Tabela 09) e da superfície de resposta (FIGURA 04) indicam que a concentração do inóculo exerce efeito positivo ao nível de significância de 5%, ou seja, dentro da faixa estudada (0,1 a 0,3 g/ 100 g de requeijão cremoso), o aumento na concentração do inóculo resulta, inicialmente, em um maior valor para a enumeração do microrganismo probiótico em estudo. Por outro lado, a temperatura exerce efeito negativo, isto é, à medida em que a temperatura aumenta há redução no número de microrganismos probióticos viáveis no requeijão cremoso.

Apesar do efeito positivo da concentração do inóculo sobre o número de microrganismos viáveis ser ressaltado por Gomes e Malcata (1999), que sugerem o uso de concentração inicial mais elevada de microrganismos probióticos no inóculo como uma das formas de promover o crescimento e a viabilidade da bifidobactéria durante a vida útil dos produtos alimentícios, essa observação foi condizente com os resultados obtidos à temperatura de 70°C. Porém, a temperatura de 50°C um aumento na concentração do inóculo, dentro da faixa estudada, não resultou em números maiores do microrganismo probiótico (Tabela 08).

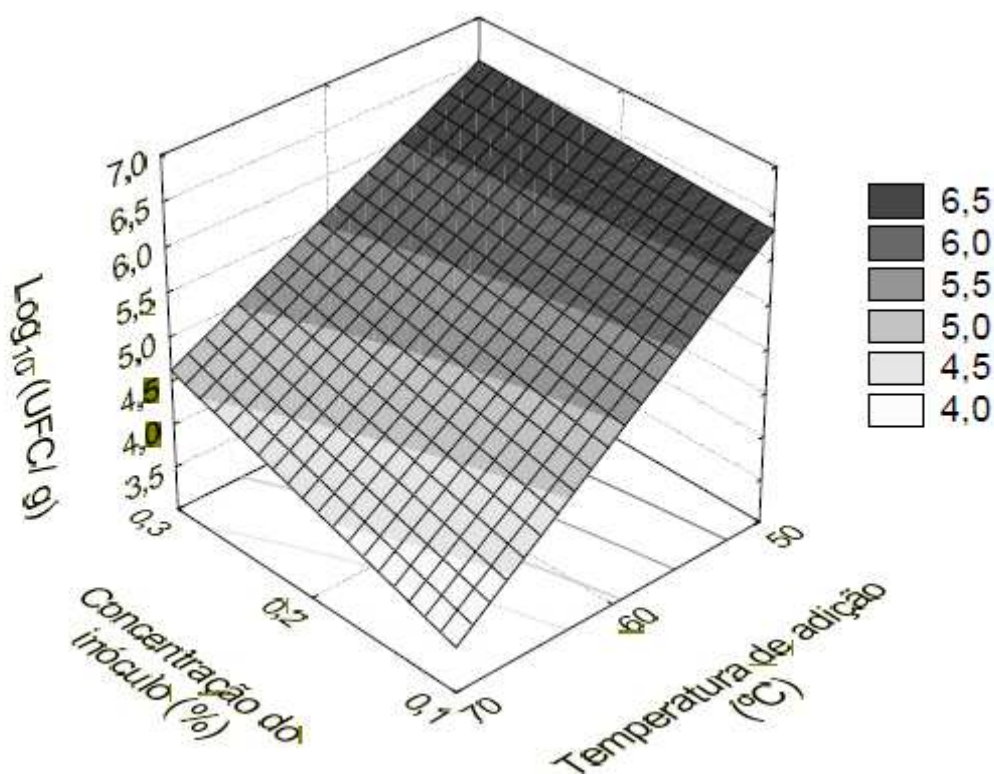


FIGURA 04 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ENUMERAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB-12 (LOG10 UFC/ G) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E TEMPERATURA DE ADIÇÃO DO INÓCULO NA FORMA LIOFILIZADA EM REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO

FONTE: O autor (2009).

Embora o efeito da temperatura seja dependente da espécie de bifidobactéria em estudo, em geral, a sensibilidade deste microrganismo aumenta à medida que a temperatura também aumenta (BOYLSTON *et al.*, 2004). Isso foi possível verificar quando se comparou, na mesma concentração utilizada de microrganismo probiótico, as diferentes temperaturas avaliadas (Tabela 08).

Porém, os tratamentos T08 e T10, elaborados pela adição do inóculo à temperatura de 50°C, mostraram vida útil inferior à média dos requeijões comerciais (cerca de 30 dias contra 60 dias), por apresentarem contaminação por bolores e leveduras e estufamento. Tal problema está diretamente associado à temperatura de

envase, conforme Moreno *et al.* (2006) que ressaltam quanto maior a temperatura de envase menor o risco de desenvolvimento de microrganismos contaminantes.

Logo, procurou-se estudar alternativas no sentido de obter um produto com a enumeração do probiótico de acordo com a literatura e com vida útil similar aos produtos encontrados no comércio alimentício. Apenas aumentar a concentração de microrganismo liofilizado às formulações e trabalhar com a temperatura de 70°C tornaria o produto inviável sob o ponto de vista econômico. Como alternativa foi realizada a adição do inóculo na forma pré-ativada, ou seja, o produto resultante da adição do microrganismo probiótico, nas mesmas concentrações do experimento, adicionado na forma liofilizada em LPDR a 10%, incubado a 37°C por 07 horas e, posteriormente, submetido à refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) até utilização (cerca de 15 horas).

A matriz dos ensaios realizados com os valores codificados e reais das variáveis concentração do inóculo e temperatura de adição e resposta (enumeração de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) das formulações com adição da cultura liofilizada pré-ativada encontram-se na Tabela 11.

TABELA 11 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS) COM A RESPOSTA DE ENUMERAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB-12 (LOG 10 UFC/ G) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM ADIÇÃO DE INÓCULO “PRÉ-ATIVADO”

TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO “PRÉ-ATIVADO” (0,1 A 0,3 g/ 100 g DE REQUEIJÃO CREMOSO)	TEMPERATURA (50 A 70°C)	<i>B. ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> Bb-12 (LOG10 UFC/G)
T15	-1 (0,1)	-1 (50)	8,6 ^{a(1)}
T16	-1 (0,1)	+1 (70)	6,9 ^b
T17	+1 (0,3)	-1 (50)	9,6 ^c
T18	+1 (0,3)	+1 (70)	9,5 ^c
T19	0 (0,2)	0 (60)	7,9 ^d
T20	0 (0,2)	0 (60)	7,7 ^d
T21	0 (0,2)	0 (60)	7,7 ^d

Fonte: O autor (2009).

NOTA: ⁽¹⁾ Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

Para todos os tratamentos foram obtidas contagem inicial de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 dentro da faixa mínima recomendada pela literatura (Tabela 11). Os tratamentos que apresentaram maior enumeração do microrganismo probiótico foram o T17 e T18 ($p \leq 0,05$), seguidos do tratamento 15, que diferiu significativamente dos tratamentos T17 e T18 por apresentar menor contagem ($p \leq 0,05$) e dos tratamentos T19, T20 e T21 por apresentar maior contagem que estes ($p \leq 0,05$). O tratamento T16 foi o que apresentou menor contagem de microrganismo probiótico ($p \leq 0,05$).

A partir dos resultados da Tabela 11 foi possível calcular os efeitos das duas variáveis estudadas (concentração de inoculo e temperatura) apresentados na Tabela 12.

TABELA 12 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ENUMERAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB-12 (LOG 10 UFC/ G) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM ADIÇÃO DE INÓCULO “PRÉ-ATIVADO”

	EFEITO	ERRO PADRÃO	T (3)	P – VALOR
MÉDIA	8,5	0,1	163,7	0,0000*
CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO	2,1	0,1	20,3	0,0024*
TEMPERATURA	-0,7	0,1	-5,6	0,0301*
CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO X TEMPERATURA	0,5	0,1	4,7	0,0422*

FONTE: O autor.

NOTA: * $p \leq 0,05$.

Os efeitos foram significativos sobre a resposta estudada (enumeração de, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12), de modo a ser calculado a ANOVA, cujos os resultados estão na Tabela 13.

Observando-se os resultados da análise de variância (Tabela 13), como $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} , permitiu construir a superfície de resposta da FIGURA 05.

TABELA 13 - ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA A RESPOSTA ENUMERAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB-12 (LOG10 UFC/ G) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO PROBIÓTICO COM ADIÇÃO DO INÓCULO “PRÉ-ATIVADO”

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F _{CALCULADO}
Regressão	6,4	3,0	2,2	80,7
Resíduos	0,1	3,0	0,0	
Total	6,5	6,0		

FONTE: O autor (2009).

NOTA: $F_{3;3;0,05} = 9,27$ ^a = soma de quadrado ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

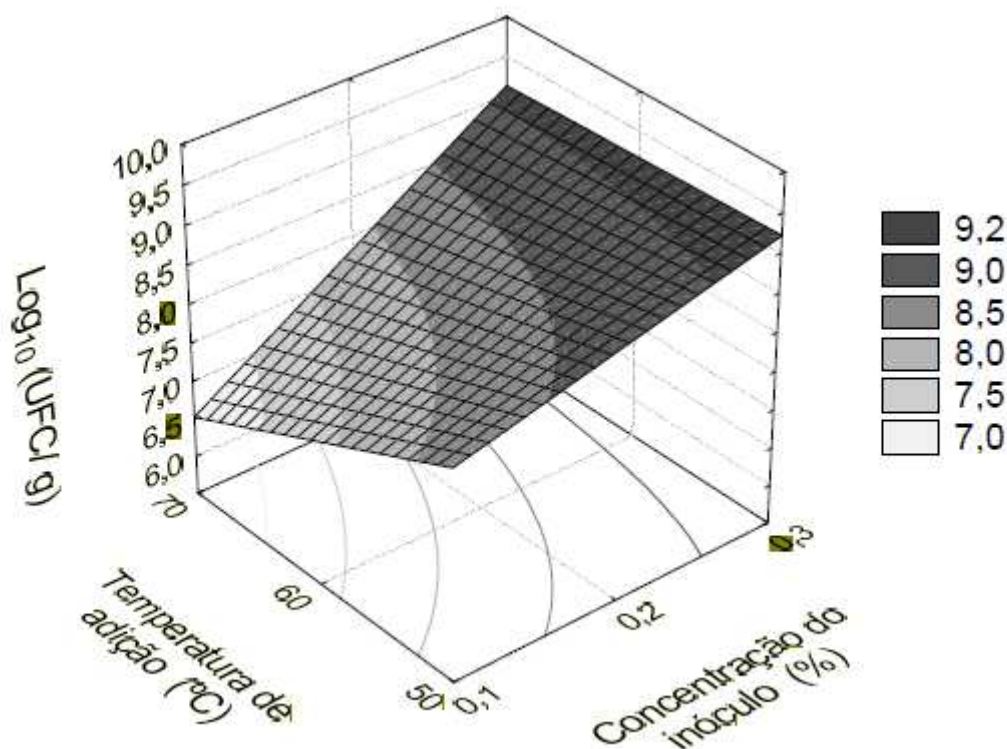


FIGURA 05 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ENUMERAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB-12 (LOG10 UFC/ G) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E TEMPERATURA DE ADIÇÃO DO INÓCULO NA FORMA “PRÉ-ATIVADA” EM REQUEIJÃO CREMOSO

FONTE: O autor (2009).

Conforme os resultados da análise de efeitos (Tabela 12) e da superfície de resposta (FIGURA 05), as variáveis estudadas (concentração do inóculo e temperatura) exercem efeitos significativos ao nível de 5% sobre a resposta enumeração de microrganismo probiótico (\log_{10} UFC/ g). Em relação à concentração do inóculo, esta apresenta efeito positivo sobre a resposta estudada, ou seja, à medida que há aumento da concentração do inóculo na formulação de requeijão, dentro da faixa 0,1 a 0,3 g/ 100 g, a enumeração do microrganismo probiótico aumenta. No entanto, o efeito da temperatura sobre a resposta foi negativa, ou seja, à medida que a temperatura aumenta, dentro da faixa estudada (50 a 70°C), há redução do número de microrganismos probióticos viáveis.

Poucos trabalhos foram feitos com o objetivo de verificar a incorporação e a sobrevivência de bifidobactéria em queijos. Daigle *et al.* (1999) avaliaram a viabilidade da produção de queijo tipo Cheddar probiótico usando creme enriquecido com retentado de fosfocaseinato nativo fermentado por *B. infantis* e verificaram que esta metodologia, além de reduzir o tempo de fabricação, foi eficaz para a obtenção de um produto com alto número de células viáveis e metabolicamente ativas, sem, contudo, causar impactos negativos nas propriedades sensoriais. Por sua vez, Bergamini *et al.* (2005) ao empregar um substrato à base de creme de leite e leite fermentado ou por *L. acidophilus* ou por *L. casei* na elaboração de queijo Pategrás Argentino afirmaram que esta tecnologia apresentou como vantagem o fato de que a etapa de pré-incubação promoveu um aumento acentuado da população probiótica no inóculo (cerca de 1 \log_{10}) o qual pode contribuir para diminuir os custos das culturas probióticas para a indústria de laticínios. Resultados similares foram encontrados neste trabalho, onde altos números de microrganismos viáveis foram obtidos inicialmente.

Porém, neste caso, também os tratamentos no qual o inóculo foi adicionado a 50°C apresentaram problemas correlacionadas com o crescimento de bolores e estufamento das embalagens, independente da alta concentração de microrganismo presente. Logo, levando-se em consideração que todos os demais tratamentos apresentaram-se dentro da contagem inicialmente desejada, baseada em dados da literatura, e que quanto maior a temperatura de envase menor o problema microbiológico, o tratamento T16 foi o escolhido.

Durante a elaboração das diferentes formulações do planejamento relativo à elaboração do requeijão cremoso simbiótico, foi acompanhada a evolução do pH e a enumeração do microrganismo probiótico para o inóculo referente ao tratamento escolhido (T16) como forma de adição, conforme descrito na Tabela 14.

Através dos resultados da Tabela 14 é possível verificar que no período de 07 horas houve crescimento do microrganismo probiótico de quase 3 log₁₀ UFC/ g concomitante a redução significativa do pH ($p \leq 0,05$), o que tornou viável a utilização desta forma de adição do microrganismo probiótico na elaboração de requeijão cremoso simbiótico.

TABELA 14 - VALORES DE PH E ENUMERAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB-12 (LOG₁₀ UFC/ G) DURANTE A INCUBAÇÃO (37°C POR 07 HORAS) E ESTOCAGEM SOB REFRIGERAÇÃO (5 ± 1°C POR 16 HORAS) EM UM SUBSTRATO COMPOSTO POR LEITE EM PÓ DESNATADO E RECONSTITUÍDO A 10%

TEMPO (HORAS)	pH	ENUMERAÇÃO DE <i>B. ANIMALIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> BB-12 (LOG ₁₀ UFC/ mL)
0	6,4 ± 0,2 ^{a(1)}	9,7 ± 0,3 ^a
07	4,3 ± 0,1 ^b	12,6 ± 0,1 ^b
15	4,4 ± 0,1 ^b	12,5 ± 0,1 ^b

FONTE: O autor (2009).

NOTA: ^{a(1)} Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$).

4.1.3 Produção de requeijão cremoso prebiótico

Inicialmente, a concentração de prebiótico (inulina e oligofrutrose) adicionada foi de 5% (m/ v), levando-se em consideração o fato de que para que este composto proporcione efeito prebiótico aos consumidores, sem ocasionar

efeitos de intolerância, doses entre 4-20 g/ dia de fibras prebióticas têm demonstrado eficácia, porém doses superiores a 20 g/ dia podem induzir a alguns efeitos indesejáveis, como flatulência e desconforto abdominal (LOSADA; OLLEROS, 2002). Foi adicionada durante a elaboração do requeijão cremoso, uma vez que menos de 1% de inulina é hidrolisada a temperaturas de 90°C por cinco minutos e de 120°C por dois minutos (ambas a pH 3,5) e é estável a temperaturas de refrigeração menores que 10°C (ORAFITI..., 2000).

A adição se deu na forma em pó, pois apesar Hennelly *et al.* (2006) terem afirmado que a melhor forma seria a adição de uma solução a quente (80°C) na concentração de 25 g de inulina/ 100 g de água, com o objetivo de facilitar a dispersão desta em produto similar ao requeijão cremoso, a forma como foi adicionada não acarretou em problemas sob o ponto de vista sensorial (Tabela 15), uma vez que para validar as formulações foi realizado a análise sensorial de Escala Hedônica e todos os tratamentos adicionados de inulina e/ ou oligofrutose apresentaram boa aceitabilidade em todos os atributos analisados por parte dos julgadores. Resultados similares foram obtidos por Garcia, Cáceres e Selgas (2006) ao adicionarem inulina em pó na elaboração de mortadela com teor normal de gordura.

TABELA 15 - MÉDIA DAS NOTAS OBTIDAS PARA A AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ATRIBUTOS DAS AMOSTRAS DE REQUEIJÃO CREMOSO PREBIÓTICO OBTIDAS NA ANÁLISE SENSORIAL DE ESCALA HEDÔNICA ESTRUTURADA DE 09 PONTOS*

ATRIBUTOS	T1 ⁽²⁾	T2	T3	T4
Manuseio	5,4 ± 2,1 ^{a(1)}	6,0 ± 1,9 ^b	6,2 ± 2,0 ^b	6,2 ± 1,9 ^b
Aroma	6,6 ± 2,1 ^a	6,9 ± 1,8 ^a	7,0 ± 1,9 ^a	7,0 ± 1,5 ^a
Sabor	7,2 ± 1,8 ^a	7,4 ± 1,3 ^a	7,7 ± 0,9 ^a	7,9 ± 1,2 ^a
Aparência	7,4 ± 1,7 ^a	7,5 ± 1,4 ^a	7,7 ± 1,2 ^a	7,7 ± 1,2 ^a
Avaliação global	7,2 ± 1,7 ^a	7,3 ± 1,2 ^a	7,7 ± 1,2 ^a	7,6 ± 1,1 ^a

FONTE: O autor (2009).

NOTA: * Média de 36 julgamentos. Escala Hedônica de 1 (desgostei muitíssimo) a 9 (gostei muitíssimo); ⁽¹⁾ Para cada variável, médias seguidas por letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey; ⁽²⁾ T1: Formulação controle, T2: 5,0% (m/m) de inulina, T3: 5,0% (m/m) de oligofrutose, T4: 2,5%:2,5% inulina:oligofrutose (m/m).

4.2 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

4.2.1 Análise das matérias-primas e do soro ácido

A qualidade dos queijos fundidos, dentre eles o requeijão, é determinada por diversos atributos de natureza física, química, nutricional, sensorial e microbiológica, que são definidos, principalmente, pela composição centesimal e propriedades físico-químicas das matérias-primas, que também está relacionado com o rendimento do processo industrial, e pela condição higiênico-sanitária das matérias-primas e dos ingredientes utilizados na fabricação desses produtos (MORENO *et al.*, 2006).

Os resultados referentes à composição centesimal e às propriedades físico-químicas do leite padronizado, homogeneizado e pasteurizado, assim como da massa e do creme de leite, utilizados na elaboração das diferentes formulações de requeijão cremoso do planejamento e do controle, e do soro de leite encontram-se na Tabela 16.

Os valores obtidos para lipídios, proteínas, EST, ESD, acidez, densidade e crioscopia (Tabela 16) estão de acordo com a legislação vigente para o leite padronizado, homogeneizado e pasteurizado (BRASIL, 2001).

No presente trabalho, o valor obtido para carboidratos (Tabela 16) foi ligeiramente superior ao determinado por Fennema (1996), que afirma que o leite pode apresentar entre 4,5% - 5,0% de carboidratos, principalmente constituído por lactose.

O teor de sais do leite é relativamente constante, entre 0,6%-0,8% do leite em peso úmido (ÓRDÓÑEZ PEREDA *et al.*, 2006). O resultado para cinzas (Tabela 16) encontra-se semelhante aos valores relatados por AMIOT (1991).

TABELA 16 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE PADRONIZADO, HOMOGENEIZADO E PASTEURIZADO, DA MASSA E DO CREME DE LEITE HOMOGENEIZADO E PASTEURIZADO UTILIZADOS NA ELABORAÇÃO DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO E DO CONTROLE, E DO SORO DE LEITE ÁCIDO

ANÁLISES ¹	LEITE PADRONIZADO, HOMOGENEIZADO E PASTEURIZADO	CREME DE LEITE HOMOGENEIZADO E PASTEURIZADO	MASSA	SORO DE LEITE ÁCIDO
Lipídios (%m/m)	3,30 ± 0,17	37,85 ± 1,18	22,92 ± 2,46	< 0,50
Proteínas (% m/m)	3,30 ± 0,02	--- ⁴	18,71 ± 0,06	0,60 ± 0,04
Carboidratos (% m/m)	5,28 ± 0,03	--- ⁴	--- ⁴	--- ⁴
EST ² (% m/m)	12,49 ± 0,21	45,10 ± 1,65	41,96 ± 1,36	5,79 ± 0,25
ESD ³ (% m/m)	9,17 ± 0,03	7,25 ± 1,66	19,05 ± 1,62	5,79 ± 0,25
Cinzas (%m/m)	0,62 ± 0,04	--- ⁴	1,76 ± 0,01	0,54 ± 0,02
pH	6,7 ± 0,1	6,6 ± 0,1	5,6 ± 0,1	5,3 ± 0,1
Acidez, em ácido láctico (% m/v)	0,16 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,26 ± 0,01
Densidade (g/mL)	1,032 ± 0,001	--- ⁴	--- ⁴	--- ⁴
Crioscopia (°H)	0,531 ± 0,001	--- ⁴	--- ⁴	--- ⁴

FONTE: O autor (2009).

NOTA: ¹Os resultados apresentam a média ± erro padrão de 03 repetições, em duplicata; ² Extrato seco total; ³ Extrato seco desengordurado; ⁴Análises físico-químicas não realizadas.

Os valores de pH determinados para o leite (Tabela 16) estão dentro da faixa de valor de pH apresentados por animais sadios (6,6-6,8); valores inferiores podem ser correlacionados com leite colostrar e superiores com leite oriundo de animais mastíticos (TRONCO, 2003; SANTOS; FONSECA, 2007).

Para creme de leite, os valores obtidos para teor de lipídios e acidez (Tabela 16) estão de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 1996) e foram similares aos considerados como valor padrão por Flemming *et al.* (2004).

Em relação à percentagem de proteína apresentada pela massa obtida neste trabalho (Tabela 16) para a produção do requeijão cremoso simbiótico, foi inferior ao determinado por Rapacci (1997), que enfatiza que a faixa ideal deveria

permanecer entre 33% a 38%. Tal resultado pode ser devido ao fato de que neste trabalho o teor de lipídios da massa foi superior ao obtido pelo autor acima citado, resultando, por tanto, em termos percentuais, em menor valor de proteína.

Os teores de lipídios para a massa e o creme de leite, assim como o teor de EST apresentado pela massa, são importantes parâmetros a serem determinados e controlados, já que são utilizados para determinar a quantidade de água a ser adicionada durante a elaboração de requeijão cremoso (VAN DENDER *et al.*, 2006). O teor de água nos queijos fundidos interfere nas propriedades reológicas do produto final e, conseqüentemente, na qualidade do mesmo (LEE; ANEMA; KLOSTERMEYER, 2004; DIMITRELI; THOMAREIS, 2004).

Os valores obtidos de EST para a massa (Tabela 16) encontram-se dentro da faixa dos valores determinados por Rappaci e Van Dender (1997) para massa obtida por acidificação direta a quente (43,58%) e estão de acordo com Fernandes *et al.* (1981), citados por Rapacci (1997), que afirmaram que o conteúdo de EST da massa deve ser padronizado em 38%-40% para fabricação de requeijão cremoso.

Os teores de cinzas da massa (Tabela 16) empregada na elaboração das diferentes formulações de requeijão cremoso do planejamento e da Formulação Controle foram inferiores ao valor determinado por Rapacci (1997), que foi de 2,83%.

O valor do pH da massa (Tabela 16) encontra-se similar ao determinado por Rapacci (1997), 5,68, e inferior ao obtido por Condack *et al.* (1995). Valores de pH nessa ordem requerem menor quantidade de sal fundente comparativamente com massas que apresentam menores valores de pH, pois segundo Oliveira (1990) a faixa ideal de pH para ocorrer a fusão se encontra entre 5,2-5,7, onde a quantidade de sal emulsificante a ser adicionado é suficiente para dispersar a caseína e complexar os íons de cálcio do caseinato. É reconhecido que quantidades elevadas de sal fundente estão associadas com problemas sensoriais, em especial com o sabor, que pode se tornar levemente salino e/ ou amargo (MAYER, 2001). Sem contar que menores quantidades de sal fundente contribuem para maior economia por parte da indústria (RAPACCI, 1997).

Comparativamente aos resultados obtidos por Rapacci (1997) para acidez da massa, estes foram inferiores quando comparado com a massa obtida por acidificação direta a quente ($0,16 \pm 0,01$ neste trabalho contra 0,42), mas similar à

massa obtida por fermentação láctica após a lavagem com leite ($0,16 \pm 0,01$ neste trabalho contra $0,10$). Apesar de não se ter lavado a massa com leite, através da metodologia adotada no tratamento final da massa, que consistiu na prensagem por 20 minutos, viragem e prensagem por mais 50 minutos, seguido de repouso da massa em câmara fria por 12 horas, foi conseguida uma maior eliminação do soro da massa e, conseqüentemente, menor acidez da mesma.

Quanto à composição do soro ácido, os resultados obtidos (Tabela 16) foram similares aos obtidos por Rapacci (1997), porém os teores de lipídios, cinzas e E.S.T. foram inferiores e o valor de pH superior aos citados por Silva, Bolini e Antunes (2004).

4.2.2 Análise das formulações de requeijão cremoso simbiótico e da Formulação Controle

A composição centesimal e as propriedades físico-químicas do requeijão cremoso simbiótico estão diretamente correlacionadas com a qualidade final deste produto, já que interferem no valor nutricional, sensorial e, até mesmo, na vida útil do produto. Assim, os resultados referentes à composição centesimal das diferentes formulações de requeijão cremoso do planejamento e a Formulação Controle encontram-se na Tabela 17.

TABELA 17 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2², COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS) COM AS RESPOSTAS PARA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL REFERENTES ÀS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO E CONTROLE

FORMULAÇÃO	x ₁ ¹	x ₂ ²	LIPÍDIOS ³ (% m/m)	PROTEÍNA ³ (% m/m)	EST ⁴ (% m/m)	UMIDADE (% m/m)	GES ⁵ (% m/m)	NaCl (% m/m)	CINZAS (% m/m)
1	-1 (0)	-1 (0)	20,83±0,93 ^a	9,35±0,75 ^a	34,27±0,46 ^a	65,72±0,46 ^a	60,79±2,92 ^a	0,58±0,03 ^a	2,50±0,07 ^a
2	-1 (0)	+1 (7)	22,67±1,72 ^a	9,12±0,79 ^a	37,19±1,81 ^b	62,81±1,81 ^b	61,85±6,61 ^a	0,56±0,04 ^a	2,33±0,03 ^b
3	+1 (7)	-1 (0)	22,00±1,22 ^a	9,22±0,56 ^a	38,47±0,99 ^b	61,53±0,99 ^b	57,25±4,04 ^a	0,58±0,03 ^a	2,34±0,09 ^b
4	+1 (7)	+1 (7)	21,75±1,36 ^a	8,54±0,26 ^a	41,52±0,59 ^c	58,48±0,59 ^c	52,38±3,13 ^b	0,60±0,02 ^a	2,17±0,11 ^c
5	0 (3,5)	0 (3,5)	21,50±1,00 ^a	9,26±0,59 ^a	37,47±1,50 ^b	62,53±1,49 ^b	57,43±3,16 ^a	0,56±0,03 ^a	2,24±0,11 ^{bc}
6	0 (3,5)	0 (3,5)	22,58±0,49 ^a	9,16±0,61 ^a	37,84±0,44 ^b	62,17±0,44 ^b	59,170±1,52 ^a	0,56±0,03 ^a	2,27±0,03 ^{bc}
7	0 (3,5)	0 (3,5)	21,83±0,82 ^a	9,29±0,45 ^a	37,36±1,10 ^b	62,64±1,1 ^b	58,46±1,91 ^a	0,56±0,03 ^a	2,23±0,10 ^{bc}
Controle	-	-	24,25±1,17	9,99±0,38	37,69±1,49	62,31 ± 0,61	64,4±3,07	0,63±0,01	2,44±0,22

FONTE: O autor (2009).

NOTA: ^a Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% de significância; ¹ concentração de inulina (g/ 100 g de requeijão cremoso simbiótico); ² concentração de oligofrutose (g/ 100 g de requeijão cremoso); ³ Média ± erro padrão – os resultados representam a média de três determinações, em duplicata; ⁴ E.S.T.= extrato seco total - média ± erro padrão – os resultados representam a média de três determinações, em duplicata; ⁵ G. E. S. = gordura no extrato seco - média ± erro padrão – os resultados representam a média de três determinações, em duplicata.

Os valores de lipídios para as diferentes formulações do planejamento experimental (Tabela 17) não apresentaram diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância, porém foram ligeiramente inferiores ao da Formulação Controle. Estes resultados são similares aos encontrados por Van Dender *et al.* (2003) ao analisarem amostras comerciais de requeijão cremoso, porém inferiores aos valores determinados por Condack *et al.* (1995) para o tratamento controle (28,9%) e superiores ao encontrado por Silva *et al.* (2004) para requeijão cremoso tradicional (18,69%). Cunha (2007), ao avaliar o teor de lipídios em amostras comerciais de requeijão, obteve valores na faixa de 24,04% a 26,87%, similares aos valores aqui obtidos para a Formulação Controle.

Quanto aos resultados obtidos para proteína, não foi observado diferença significativa entre as formulações do planejamento ($p > 0,05$), que, em geral, aproximaram-se da formulação controle (Tabela 17). Estes resultados foram inferiores aos resultados obtidos por Rappaci (1997), que variaram entre 10,61% a 11,78%, e por Oliveira (2003), que foram de 11,20% para requeijão cremoso e 12,40% para requeijão cremoso adicionado de transglutaminase, porém dentro da faixa de teor de lipídios encontrados por Van Dender *et al.* (2003) (8,58% a 11,09%) e Cunha (2007) (8,54% a 11,00%) para amostras de requeijão cremoso comercial.

Em relação ao EST, houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre as diferentes formulações. A Formulação 04 apresentou os maiores valores para EST ($p \leq 0,05$) comparativamente às demais formulações, ao passo que a Formulação 01 apresentou os menores valores ($p \leq 0,05$) (Tabela 17). Em geral, os resultados obtidos foram próximos à faixa de valores encontrados por Van Dender *et al.* (2003) ao avaliarem amostras de requeijão cremoso comercial (36,79% a 44,04%), com exceção para a Formulação 01, cujo valor aproximou-se do obtido por Silva *et al.* (2004), 32,53%.

Segundo Van Dender (2006), o requeijão cremoso deve apresentar um teor de EST de 38% a 40%. Comparando-se esta faixa com os valores médios de EST, com seus respectivos erros - padrão, das formulações do

planejamento, com exceção da Formulação 1 e da Formulação Controle, pode-se constatar que as formulações se encontram dentro desta faixa.

A partir dos resultados obtidos na determinação de EST é possível obter o teor de umidade das formulações do planejamento e da formulação controle, que também é um parâmetro previsto pela legislação vigente, que determina teor máximo de umidade de 65% no produto final (BRASIL, 1997). Dessa forma, todas as formulações do planejamento, com exceção da Formulação 01, encontram-se dentro dos valores recomendados (Tabela 17). Apesar de Ong, Henriksson e Shah (2006) afirmarem que a cultura probiótica em si não apresenta efeito direto na composição centesimal inicial de queijos, neste trabalho a Formulação 01 (somente probiótica) apresentou maior teor de umidade comparativamente a Formulação Controle. Isto se deve, provavelmente, ao fato de que a cultura probiótica foi adicionada na forma pré-ativada em LPDR a 10%, colaborando, portanto, para o aumento da umidade final do produto.

O fato da Formulação 01 não se encontrar dentro do parâmetro estipulado pela legislação não implica, somente, em um produto fora dos padrões de identidade e qualidade, mas pode, também, implicar em menor vida útil, já que o teor de umidade, juntamente com a atividade de água dos alimentos, é decisiva na conservação de alimentos, pois quanto maior a umidade e/ ou atividade de água maior a disponibilidade de água para uso microbiano e reações de deterioração (RABÊLO *et al.*, 2002).

As formulações do planejamento diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância para GES, onde a Formulação 04 apresenta o menor valor para esta análise ($p \leq 0,05$) em comparação às demais formulações, que não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$) (Tabela 17). Em relação à legislação vigente para requeijão (BRASIL, 1997), com exceção da Formulação 04, todas as demais formulações atendem a exigência de, no mínimo, 55% de GES no produto final para poder considerá-lo requeijão cremoso. Comparativamente a outros trabalhos, os teores de GES obtidos (Tabela 17), com exceção da Formulação 04, foram similares à faixa de GES determinados por Van Dender *et al.* (2003) em requeijão cremoso

comercializados em supermercados na cidade de Campinas (SP) (57,00% a 71,03%) e por Cunha (2007) também para requeijão cremoso comercial (54,39% a 64,61%).

O teor de cloretos apresentado pelas formulações do planejamento são estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$) entre si e similares ao valor determinado para a Formulação Controle (Tabela 17). Rappaci e Van Dender (1998) obtiveram valores mais elevados para cloretos (0,98% a 1,06%) comparativamente aos obtidos neste trabalho, ao passo que Oliveira (2003) obteve valor inferior para requeijão cremoso (0,26%).

Quanto aos valores obtidos para cinzas (Tabela 17) é possível verificar que as amostras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade. A Formulação 01 apresentou valores mais elevados comparativamente às demais formulações do planejamento ($p \leq 0,05$), porém similar ao valor obtido para a Formulação 03 e Formulação Controle. As Formulações 02, 03, 04, 05, 06 e 07 não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$). Os resultados obtidos para as Formulações do planejamento e Controle foram similares aos valores obtidos por Rappaci e Van Dender (1997), 2,11% a 2,54%, e por Van Dender *et al.* (2003), 1,42% a 2,67%, porém inferiores ao valor obtido por Picolli (2006) na formulação padrão (2,86%).

Em geral, as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) observadas entre as formulações do planejamento e a formulação controle devem-se à adição de inulina e de oligofrutose, já que, em termos percentuais, todos os demais ingredientes sofrem redução na sua quantidade. Essas variações na composição centesimal foram verificadas por Garcia, Cáceres e Selgas (2006), quando da avaliação da composição centesimal de mortadela controle e adicionada de inulina. Buriti *et al.* (2007) também obtiveram teores mais baixos de lipídios, proteínas e cinzas para as amostras adicionadas de inulina comparativamente às amostras probióticas e controle de queijo cremoso fresco.

Em relação aos parâmetros físico-químicos avaliados para as diferentes formulações do planejamento e para a Formulação Controle, os resultados encontram-se descritos na Tabela 18.

TABELA 18 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2², COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS) COM AS RESPOSTAS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO E CONTROLE

FORMULAÇÃO	x ₁ ¹	x ₂ ²	pH ³	ACIDEZ, EM ÁCIDO LÁTICO (% m/m) ³
1	-1 (0)	-1 (0)	5,9±0,1	0,34±0,02
2	-1 (0)	+1 (7)	5,9±0,1	0,29±0,01
3	+1 (7)	-1 (0)	5,9±0,1	0,30±0,06
4	+1 (7)	+1 (7)	5,9±0,1	0,30±0,03
5	0 (3,5)	0 (3,5)	5,9±0,1	0,30±0,05
6	0 (3,5)	0 (3,5)	5,9±0,1	0,29±0,01
7	0 (3,5)	0 (3,5)	5,9±0,1	0,31±0,02
Controle	-	-	6,2±0,1	0,30±0,04

FONTE: O autor (2009).

NOTA: ¹ concentração de inulina (g/ 100 g de requeijão cremoso simbiótico); ² concentração de oligofrutose (g/ 100 g de requeijão cremoso); ³ Média ± erro padrão – os resultados representam a média de três determinações, em duplicata.

Para os valores obtidos de pH, não foi detectada diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações do planejamento experimental (Tabela 18), onde os valores de pH se encontraram na faixa de 5,9. No entanto, a Formulação Controle apresentou valor mais elevado de pH comparado às demais formulações (6,2). Essa diferença deve-se ao fato de que para a elaboração do requeijão cremoso simbiótico, a adição do inóculo foi realizado na forma denominada de pré-ativada, ou seja, em LPDR a 10% previamente fermentado pelo microrganismo probiótico, o que contribuiu para a redução do pH. A redução do valor de pH das formulações adicionadas de probióticos em relação à Formulação Controle também foi observada por Blanchette, Roy e Gauthier (1996) quando adicionaram creme fermentado por bifidobacteria na elaboração de queijo Cottage e por Bergamini *et al.* (2009) ao adicionarem uma mistura de probióticos (*L. acidophilus*, *L. paracasei* subps. *paracasei* e *B. lactis*) pré-incubada em um substrato composto por leite e gordura láctea.

Em geral, os valores aqui encontrados para pH foram superiores aos valores determinados por Van Dender *et al.* (2005) ao analisarem diferentes

marcas de requeijão cremoso (5,63 a 5,86). Porém, para as amostras comerciais de requeijão cremoso avaliadas por Cunha (2007) a faixa de pH (5,13 a 5,95) apresentou-se próxima da obtida neste trabalho. Rapacci e Van Dender (1998), ao analisarem o efeito do tipo e concentração de sal fundente nas características físico-químicas do requeijão empregando massa obtida por acidificação direta a quente, obtiveram valores na faixa de 5,92 a 6,35, que se aproximam do valor de pH da Formulação Controle, porém são superiores aos valores para as formulações do planejamento.

Segundo revisão de literatura realizada por Kapoor e Metzger (2008), o pH final de queijos processados deveria ficar na faixa de 5,4 a 5,8. Comparando-se os resultados (média \pm erro padrão) obtidos neste trabalho, todas as formulações do planejamento enquadram-se nesta faixa considerada ideal, com exceção da Formulação Controle que apresentou valor superior. Ainda, é importante frizar que valores de pH na faixa de 6,0 a 6,35 poderiam comprometer a vida útil do produto final (RAPACCI; VAN DENDER, 1998).

A adição de inulina e de oligofrutose não alterou significativamente o pH das formulações do planejamento (Tabela 18). Guggisberg *et al.* (2009) verificaram que a adição de inulina não influencia significativamente os valores de pH de iogurtes com baixo teor de gordura. Akalin e Erisir (2008) obtiveram valores de pH estatisticamente semelhantes para as formulações de sorvete probiótico, sorvete probiótico adicionado de inulina e sorvete probiótico adicionado de oligofrutose; porém, os tratamentos diferiram da formulação controle (sem probiótico e sem prebiótico), apresentando menores valores de pH, similarmente ao comportamento das formulações deste experimento

Quanto à acidez, expressa em ácido láctico, as formulações não apresentam diferença estatística significativa ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 18) e os resultados foram próximos ao da Formulação Controle. Rapacci e Van Dender (1998) obtiveram maiores valores de acidez (45 a 54° D) comparados aos obtidos neste trabalho, assim como Cunha (2007), que obteve valores na faixa de 0,50% a 0,62% de ácido láctico.

4.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE TEXTURA

O requeijão cremoso é um sistema complexo, composto por proteínas, gordura, água, sais minerais e sais emulsificantes, sendo que suas principais características de textura são: firmeza, elasticidade, coesividade, adesividade e gomosidade (ANJOS *et al.*, 2006). Em muitos casos, a avaliação dessas características é tão importante quanto qualquer outra característica sensorial, em especial sabor e aroma, e exerce um papel fundamental na percepção da qualidade global e preferência por parte do consumidor (FOEGEDING *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos para o Perfil de Textura dos diferentes tratamentos do planejamento, bem como da Formulação Controle, encontram-se descritos na Tabela 19.

Em relação à firmeza após 03 dias de fabricação, a Formulação 1 (somente probiótica) apresentou maior firmeza ($p \leq 0,05$) quando comparado aos demais tratamentos adicionados de ingredientes prebióticos. Comparativamente à Formulação Controle, todas as formulações do planejamento apresentaram menor firmeza (Tabela 19). Vários são os fatores que podem influenciar na firmeza de queijos processados, dentre eles composição, pH, tipo e concentração de sal emulsificante e grau de maturação da massa base a ser usada na fusão, além, é claro, dos parâmetros de processamento, incluindo tempo, temperatura e velocidade de agitação (FOX; GUINEE; COGAN, 2000). Ao avaliar os fatores mencionados, os valores referentes ao pH da Formulação Controle foram diferentes dos valores de pH obtidos para as formulações do planejamento (Tabela 18). No entanto, não pode ser considerado o único fator responsável pela diferença de firmeza entre as amostras, pois segundo Templeton e Sommer (1932), citados por Van Dender *et al.* (2005), valores de pH variando na faixa de 5,7 a 6,3 exercem pouca influência sobre o corpo e a textura de queijos processados untáveis. Por sua vez, a ação do sal emulsificante sobre as características texturais

finais do queijo processado, em especial a firmeza, pode variar de acordo com o pH (BRICKLEY *et al.*, 2008). Shirashoji e Lucey (2008) verificaram que ao utilizar hexametáfosfato de sódio (mesmo sal fundente utilizado neste trabalho) na elaboração de queijo processado houve um aumento da dureza à medida que o pH aumentou, o que foi similar ao resultado obtido neste trabalho ao comparar os valores de pH (Tabela 18) e firmeza (Tabela 19) entre a Formulação Controle e as demais formulações do planejamento. Estes autores sugerem que o sal fundente promove aumento na dispersão das caseínas por se associar a elas e, conseqüentemente, aumenta a repulsão eletrostática, bem como por apresentar alta habilidade em se ligar ao cálcio da matriz do queijo durante o aquecimento na elaboração de queijos processados, resultando, portanto, em um produto final mais firme. Piccolo (2006) obteve para a formulação padrão de requeijão valor para firmeza de $0,53 \pm 0,03N$, valor similar às formulações do planejamento adicionadas de inulina e de oligofrutose, porém inferior aos valores obtidos para as Formulações 01 e Controle.

Com o objetivo de verificar se as variáveis estudadas (inulina e oligofrutose) exerceram efeitos significativos sobre a resposta firmeza, foram calculados os efeitos para os valores referentes ao 3º dia de fabricação, que estão apresentados na Tabela 20.

Devido ao fato de que os efeitos foram significativos sobre a resposta estudada, foi calculado a ANOVA, cujos resultados estão descritos na Tabela 21.

TABELA 19 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2², COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS) COM AS RESPOSTAS FIRMEZA (N), ADESIVIDADE (N.s), COESIVIDADE, ELASTICIDADE E GOMOSIDADE (N) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO E CONTROLE UTILIZANDO A ANÁLISE DE PERFIL DE TEXTURA, COM 03 E 60 DIAS DE FABRICAÇÃO

FORMULAÇÃO	x ₁ ¹	x ₂ ²	DIAS DE FABRICAÇÃO	FIRMEZA (N)	ADESIVIDADE (N.s) ³	COESIVIDADE ⁴	ELASTICIDADE ⁴	GOMOSIDADE (N) ⁴
1	-1 (0)	-1 (0)	03	0,76 ± 0,02 ^{Aa}	1,10 ± 0,02 ^{Aa}	0,78 ± 0,01 ^{Aa}	0,94 ± 0,01 ^a	0,57 ± 0,04 ^{Aa}
			60	2,34 ± 0,33 ^{Bb}	2,42 ± 0,09 ^{Bb}	0,61 ± 0,02 ^{Cb}	0,93 ± 0,02 ^a	1,16 ± 0,20 ^{Bb}
2	+1 (0)	-1 (7)	03	0,48 ± 0,03 ^{Cc}	0,56 ± 0,06 ^{Cc}	0,82 ± 0,01 ^{ABb}	0,95 ± 0,01 ^a	0,38 ± 0,03 ^{Cc}
			60	1,95 ± 0,02 ^{Dd}	1,19 ± 0,09 ^{Dd}	0,69 ± 0,06 ^{CDbc}	0,95 ± 0,01 ^a	0,77 ± 0,05 ^{Dd}
3	-1 (7)	+1 (0)	03	0,44 ± 0,09 ^{Cc}	0,46 ± 0,04 ^{Cc}	0,83 ± 0,02 ^{Bb}	0,95 ± 0,02 ^a	0,37 ± 0,02 ^{Cc}
			60	0,84 ± 0,01 ^{Ee}	1,10 ± 0,03 ^{Dd}	0,70 ± 0,04 ^{CDc}	0,93 ± 0,01 ^a	0,59 ± 0,04 ^{Ee}
4	+1 (7)	+1 (7)	03	0,41 ± 0,06 ^{Cc}	0,45 ± 0,06 ^{Cc}	0,85 ± 0,03 ^{Bb}	0,96 ± 0,02 ^a	0,38 ± 0,02 ^{Cc}
			60	0,96 ± 0,01 ^{Ef}	1,18 ± 0,08 ^{Dd}	0,77 ± 0,07 ^{Dc}	0,95 ± 0,03 ^a	0,57 ± 0,10 ^{Ee}
5	0 (3,5)	0 (3,5)	03	0,47 ± 0,03 ^{Cc}	0,54 ± 0,05 ^{Cc}	0,83 ± 0,02 ^{Bb}	0,94 ± 0,01 ^a	0,37 ± 0,04 ^{Cc}
			60	1,03 ± 0,04 ^{Ee}	1,22 ± 0,20 ^{Dd}	0,75 ± 0,04 ^{Dc}	0,93 ± 0,01 ^a	0,69 ± 0,07 ^{Ede}
6	0 (3,5)	0 (3,5)	03	0,49 ± 0,06 ^{Cc}	0,53 ± 0,06 ^{Cc}	0,82 ± 0,02 ^{Bb}	0,95 ± 0,01 ^a	0,43 ± 0,08 ^{Cc}
			60	1,07 ± 0,13 ^{Eef}	1,29 ± 0,26 ^{Dd}	0,74 ± 0,03 ^{Dc}	0,93 ± 0,01 ^a	0,63 ± 0,03 ^{Ee}
7	0 (3,5)	0 (3,5)	03	0,46 ± 0,02 ^{Cc}	0,51 ± 0,01 ^{Cc}	0,83 ± 0,01 ^{Bb}	0,95 ± 0,01 ^a	0,38 ± 0,01 ^{Db}
			60	1,01 ± 0,08 ^{Eef}	1,12 ± 0,03 ^{Dd}	0,76 ± 0,01 ^{Dc}	0,94 ± 0,01 ^a	0,61 ± 0,04 ^{Ee}
Controle	-	-	03	2,41 ± 0,18	4,34 ± 0,41	0,76 ± 0,03	0,94 ± 0,01	1,68 ± 0,34
			60	3,37 ± 0,09	5,07 ± 0,04	0,67 ± 0,01	0,94 ± 0,01	2,24 ± 0,01

FONTE: O autor (2009).

NOTA: ^{A(1)} Médias, de três repetições, seguidas por letras iguais maiúsculas, na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de significância; ^{a(1)} Médias, de três repetições, seguidas por letras iguais minúsculas, na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa entre os tempos para cada tratamento ao nível de 5% de significância; ¹ concentração de inulina (g/ 100 g de requeijão cremoso simbiótico); ² concentração de oligofrutose (g/ 100 g de requeijão cremoso); ³ Média negativa; ⁴ Média adimensional.

TABELA 20 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO FIRMEZA (N) DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO

	EFEITO	ERRO PADRÃO	T (3)	P - VALOR
MÉDIA	0,47	0,01	68,25	0,0002*
INULINA	-0,05	0,01	-3,53	0,0716*
OLIGOFRUTOSE	-0,09	0,01	-6,43	0,0233*
INULINA X OLIGOFRUTOSE	0,02	0,01	1,50	0,2722

FONTE: O autor (2009).

NOTA: * $p \leq 0,05$ e * $p \leq 0,10$.

TABELA 21 - ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO FIRMEZA (N) DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F _{CALCULADO}
Regressão	0,08	3,00	0,03	175,33
Resíduos	0,00	3,00	0,00	
Total	0,08	6,00		

FONTE: O autor (2009).

NOTA: $F_{3;3;0,05} = 9,27$; $F_{3;3;0,10} = 5,39$ ^a = soma de quadrado ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

Observando-se os resultados para análise de variância (Tabela 21), como $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} foi possível construir a superfície de resposta da FIGURA 06.

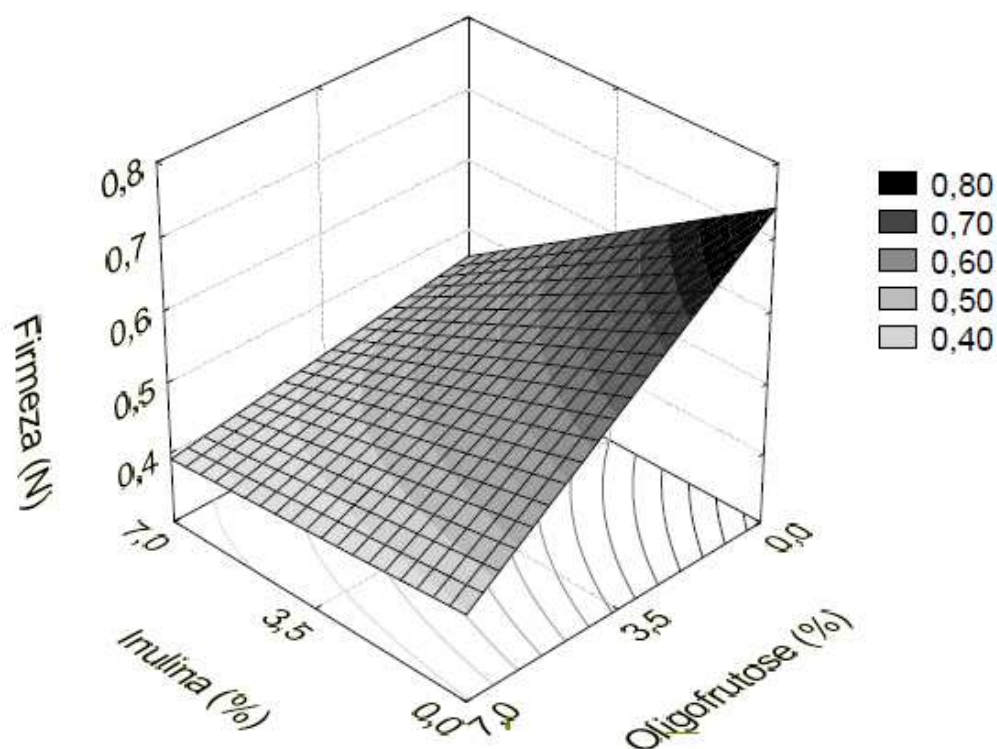


FIGURA 06 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA FIRMEZA (N) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INULINA (G /100 G) E DE OLIGOFRUTOSE (G /100 G) EM REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO

FONTE: O autor (2009).

Conforme os resultados da análise de efeitos (Tabela 20) e da superfície de resposta (FIGURA 06) pode-se observar que as variáveis (inulina e oligofrutose) exercem efeito negativo significativo ao nível de 10% de significância sobre a resposta avaliada (firmeza). Assim, o acréscimo das concentrações dos prebióticos inulina e oligofrutose, dentro da faixa estudada (0 - 7 g/ 100 g), resulta em valores estatisticamente inferiores ($p \leq 0,10$) no atributo firmeza para as formulações simbióticas (F2, F3, F4, F5, F6 e F7) em relação à formulação probiótica (F1).

Este resultado não foi similar ao obtido por Buriti, Cardarelli e Saad (2008) ao avaliarem a firmeza de queijo fresco cremoso simbiótico elaborado pela adição de inulina e do microrganismo probiótico *Lactobacillus paracasei*,

no qual não foi detectada diferença significativa em relação à formulação somente probiótica.

Apesar da literatura afirmar, em geral, que o aumento do teor de sólidos totais contribui para um aumento da firmeza, isso não foi observado neste trabalho. Ao contrário, as formulações contendo os prebióticos, apesar de apresentarem maior teor de EST (Tabela 17), mostraram os menores valores de firmeza (Tabela 19). Tal fato pode ser devido às concentrações avaliadas no presente trabalho que não resultaram na geleificação da inulina, já que segundo Kim, Faqih e Wang (2001), não se forma gel de inulina, nem por aquecimento nem por agitação, em concentrações na ordem de 5% (m/v) em soluções modelo; já na concentração de 10% forma-se gel, apenas, sob aquecimento e posterior resfriamento, porém na faixa de temperatura de 80-90°C, similar à utilizada durante a fusão da massa para elaboração do requeijão, essa formação é muito menor, provavelmente porque nesta temperatura as cadeias de inulina sofrem hidrólise, ocorrendo um aumento no teor de açúcares redutores. Por sua vez, a oligofrutose naturalmente não forma gel devido o tamanho da cadeia ser muito pequeno (FRANCK, 2002). Ainda, devido ao fato de que a inulina e/ ou oligofrutose, além de não formarem gel nas concentrações avaliadas, podem interferir na interação caseína-cálcio e caseína-caseína, alterando, portanto, a firmeza. Isso foi verificado por Pasephool, Small e Sherkat (2008), onde a inulina foi responsável pela redução da firmeza do gel de iogurte. Ainda, Glibowski (2009) verificou uma ação antagônica da inulina sobre a formação de gel pelas proteínas do soro que resultou na redução da firmeza em sistemas constituídos por inulina e proteínas do soro de leite.

Aos 60 dias de fabricação, todas as formulações do planejamento, bem como a Formulação Controle, apresentaram aumento para os valores de firmeza ($p \leq 0,05$) comparativamente aos valores determinados no terceiro dia de fabricação (Tabela 19). Comportamento similar foi observado por Oliveira (2003), que verificou aumento da firmeza para requeijão cremoso controle e adicionado de transglutaminase durante 20 dias de armazenamento. Entre os tratamentos, a Formulação 01 continuou apresentando maior firmeza ($p \leq 0,05$)

quando comparada às demais formulações, porém ainda inferior comparado à Formulação Padrão. No entanto, a Formulação 02, contendo inulina, apresentou um aumento significativo ($p \leq 0,05$) da firmeza em relação às Formulações 03, 04, 05, 06 e 07 (Tabela 19). Por sua vez, a Formulação 03 apresentou o menor valor para firmeza em relação às demais formulações ($p \leq 0,05$).

Apesar do aumento da firmeza ter sido característico para todos os tratamentos durante a vida útil, com o objetivo de avaliar se as variáveis estudadas (inulina e oligofrutrose) exercem efeitos sobre a firmeza de requeijão cremoso simbiótico com 60 dias, foi calculado a análise de efeitos que se encontra na Tabela 22.

TABELA 22 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO FIRMEZA (N) DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO

	EFEITO	ERRO PADRÃO	T (3)	P - VALOR
MÉDIA	1,27	0,01	92,88	0,0001*
INULINA	0,35	0,03	12,748	0,0061*
OLIGOFRUTOSE	-0,76	0,03	-27,518	0,0013*
INULINA X OLIGOFRUTOSE	-0,22	0,03	-8,018	0,0152*

FONTE: O autor (2009).

NOTA: * $p \leq 0,05$.

Devido ao fato de que os efeitos foram significativos sobre a resposta estudada ($p \leq 0,05$), foi calculado a ANOVA, cujos resultados estão descritos na Tabela 23.

TABELA 23 - ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO FIRMEZA (N) DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F _{CALCULADO}
Regressão	2,04	3,00	0,68	1091,73
Resíduos	0,00	3,00	0,00	
Total	2,04	6,00		

FONTE: O autor (2009).

NOTA: $F_{3;3;0,05} = 9,27$ ^a = soma de quadrado ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

Observando-se os resultados para análise de variância (Tabela 23), como $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} foi possível construir a superfície de resposta da FIGURA 06.

Conforme os resultados da análise de efeitos (Tabela 22) e da superfície de resposta (FIGURA 07) pode-se observar que a variável inulina exerce efeito positivo significativo ao nível de 5% de significância sobre a resposta avaliada (firmeza), ou seja, um aumento na concentração de inulina, dentro da faixa de concentração estudada (0 a 7 g/ 100 g), resulta em um aumento da firmeza para os tratamentos com 60 dias de vida útil. Comparativamente ao terceiro dia de fabricação, houve uma modificação da ação da inulina sobre o parâmetro avaliado, já que inicialmente contribuía para a redução da firmeza (Tabela 25 e FIGURA 06). Buriti, Cardarelli e Saad (2008) também verificaram aumento significativo da firmeza de queijos frescos simbióticos elaborados a partir da adição de *L. paracasei* e inulina durante a vida útil deste produto. Já Koca e Metin (2004) verificaram redução da firmeza de queijo Kashar com teor reduzido de gordura adicionado de inulina durante 90 dias de armazenamento.

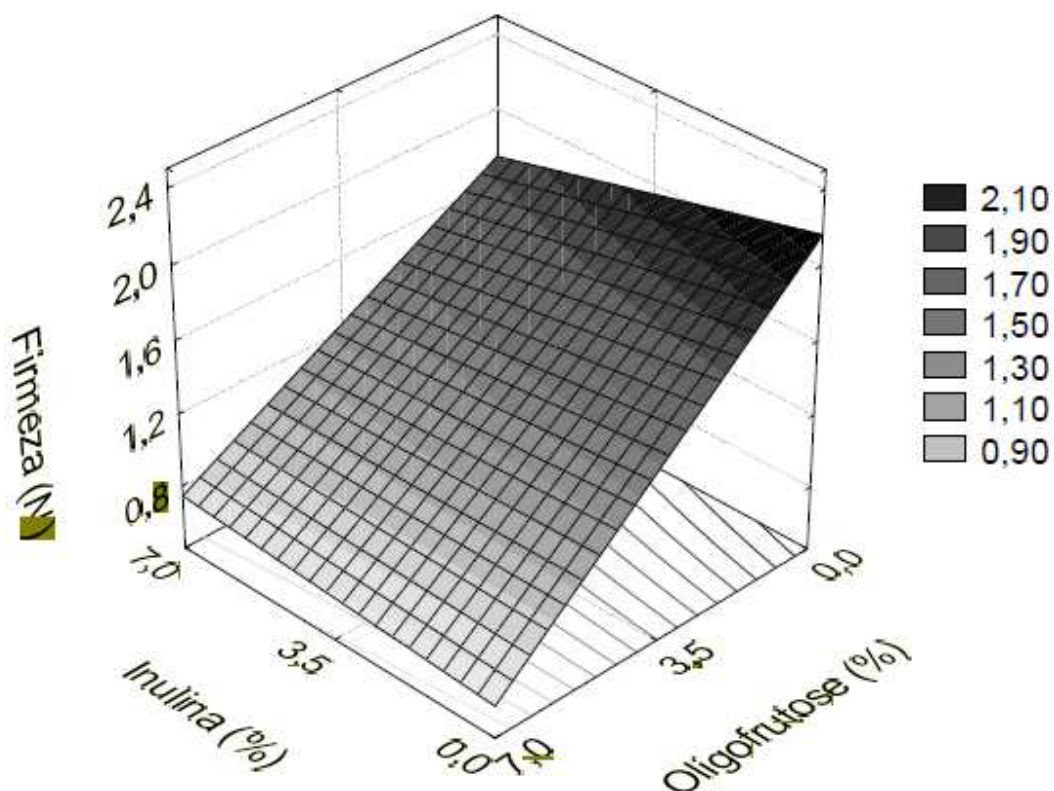


FIGURA 07 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA FIRMEZA (N) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INULINA (G/ 100 G) E DE OLIGOFRUTOSE (G/ 100 G) EM REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO

FONTE: O autor (2009).

No entanto, a adição de oligofrutose continua a exercer efeito negativo sobre o atributo firmeza, ou seja, nas concentrações avaliadas (0 – 7 g/ 100 g) um aumento na concentração de oligofrutose promove redução do parâmetro avaliado (Tabela 23). Paseephol, Small e Sherkat (2008) não verificaram mudanças na firmeza de iogurte adicionado de oligofrutose. Por sua vez, Akalin e Eresir (2008) verificaram um aumento para a firmeza de sorvetes elaborados com a adição de inulina e com a adição de oligofrutose ao longo da vida útil avaliada (90 dias), sendo que a inulina promoveu maior aumento comparada a oligofrutose.

Em relação aos resultados obtidos para adesividade no terceiro dia de fabricação (Tabela 19), similarmente aos resultados obtidos para a firmeza, a Formulação 1 diferenciou significativamente das demais formulações do planejamento, apresentando menor adesividade ($p \leq 0,05$). A Formulação Controle, por sua vez, apresentou menor adesividade em relação a todas as formulações do planejamento. Aqui, novamente, o tipo de sal emulsificante associado ao pH do produto final pode ter influenciado nesta diferença. Comparativamente aos resultados obtidos neste trabalho, o valor de adesividade obtido para a Formulação Padrão desenvolvida por Picolli (2006), $-2,04 \pm 0,02$ N.s, foi inferior aos obtidos para as formulações do planejamento e superior à da Formulação Controle. Já em relação aos valores encontrados por Yanjie, Shirashoji e Lucey (2007) para amostras de queijos processados pasteurizados, que variaram na faixa de 1,02 a 2,53 N.s., a Formulação 01 do planejamento ficou dentro desta média (Tabela 19), porém as demais formulações do planejamento foram superiores em adesividade, ao passo que a Formulação Controle apresentou valor inferior.

Visando avaliar se as variáveis estudadas (inulina e oligofrutose) exerceram efeitos significativos sobre a resposta adesividade, os efeitos foram calculados e estão descritos na Tabela 24.

TABELA 24 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ADESIVIDADE (N.s) DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO

	EFEITO	ERRO PADRÃO	T (3)	P - VALOR
MÉDIA	-0,53	0,01	-77,84	0,0002*
INULINA	0,06	0,01	4,52	0,0456*
OLIGOFRUTOSE	0,16	0,01	11,77	0,0071*
INULINA X OLIGOFRUTOSE	-0,06	0,01	-4,08	0,0552

FONTE: O autor (2009).

NOTA: * $p \leq 0,05$

Devido ao fato de que os efeitos foram significativos sobre a resposta estudada, foi calculado a ANOVA, cujos resultados estão descritos na Tabela 25.

TABELA 25 - ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ADESIVIDADE (N.s) DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO

FONTE DE VARIAÇÃO	SQa	GLb	QM _c	F _{CALCULADO}
Regressão	0,31	3,00	0,10	663,16
Resíduos	0,00	3,00	0,00	
Total	0,31	6,00		

FONTE: O autor (2009).

NOTA: $F_{3;3;0,05} = 9,27$ a = soma de quadrado; b = graus de liberdade; c = quadrados médios.

Observando-se os resultados para análise de variância (Tabela 25), como $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} foi possível construir a superfície de resposta da FIGURA 08.

Conforme os resultados da análise de efeitos (Tabela 24) e da superfície de respostas (FIGURA 08) pode-se observar que, dentro da faixa estudada (0 – 7 g/ 100 g), a inulina e a oligofrutose exercem efeito positivo significativo na resposta adesividade ao nível de 5% de probabilidade, ou seja, o aumento na concentração destes ingerdientes prebióticos contribui para um aumento da adesividade.

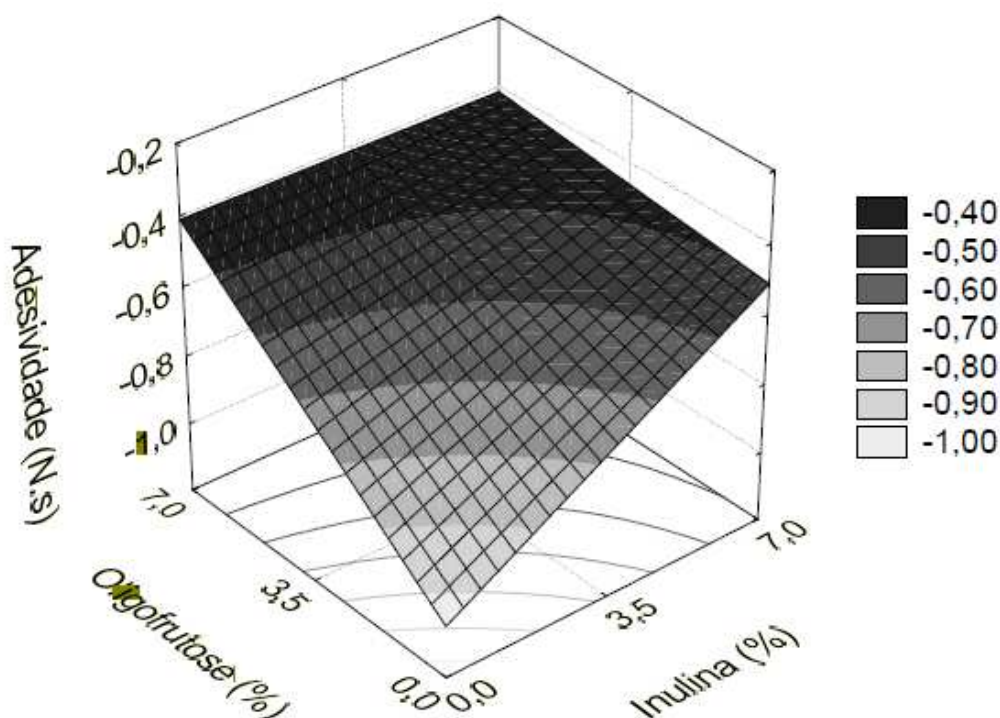


FIGURA 08 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ADESIVIDADE (N.s) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INULINA (G/ 100 G) E DE OLIGOFRUTOSE (G/ 100 G) EM REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO

FONTE: O autor (2009).

Similar ao comportamento de especialidade láctea determinado por Van Dender *et al.* (2005), a adesividade aumentou à medida que houve um aumento no teor de carboidratos totais (Tabela 19). Estes autores sugerem que isso se deve ao comportamento do carboidrato, no caso, avaliado que por eles foi amido modificado. No presente trabalho, os carboidratos utilizados foram a inulina e a oligofrutose. Estes carboidratos, quando presentes em formulações alimentícias, têm a capacidade de aumentar a retenção de água, conferir viscosidade e podem ser utilizados como substitutos de gordura (NINESS, 1999; FRANCK, 2002). No entanto, Buriti, Cardarelli e Saad (2008) não verificaram aumento da adesividade do queijo fresco cremoso quando

adicionado de *Lactobacillus paracasei* e de inulina comparativamente à formulação padrão e somente probiótica.

Após 60 dias de armazenamento, foi verificada redução no valor da adesividade para todos as formulações do planejamento e para a Formulação Controle (Tabela 19). Uma redução da adesividade também foi verificada por Oliveira (2003) para requeijão cremoso durante 20 dias de armazenamento. A Formulação 01 apresentou menor adesividade que as demais formulações ($p \leq 0,05$), porém superior à apresentada pela Formulação Controle (Tabela 20).

Com o objetivo de avaliar se as variáveis estudadas (inulina e oligofrutose) exercem efeitos sobre a adesividade de requeijão cremoso simbiótico com 60 dias, foi calculado a análise de efeitos que se encontra na Tabela 26.

TABELA 26 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ADESIVIDADE (N.s) DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO

	EFEITO	ERRO PADRÃO	T (3)	P - VALOR
MÉDIA	-1,24	0,04	-32,41	0,0010*
INULINA	0,13	0,08	1,64	0,2429
OLIGOFRUTOSE	0,22	0,08	2,81	0,1070
INULINA X OLIGOFRUTOSE	-0,21	0,08	-2,78	0,1088

FONTE: O autor (2009).

NOTA: * $p \leq 0,05$

A partir dos resultados da Tabela 26 é possível concluir que as variáveis estudadas não interferem significativamente ao nível de 5% de significância na resposta adesividade para requeijão cremoso simbiótico com 60 dias de armazenamento. No entanto, continua apresentando tendência em contribuir positivamente para a resposta, ou seja, um aumento nas concentrações de inulina e de oligofrutose, dentro da faixa estudada (0 – 7 g/

100 g), aumenta os valores de adesividade. Analisando os dados da Tabela 19, em módulo, os resultados obtidos neste trabalho foram similares aos obtidos por Buriti, Cardarelli e Saad (2008), que também verificaram aumento da adesividade durante a vida útil de queijo fresco simbiótico.

A coesividade apresentada pela Formulação 1 difere estatisticamente ($p \leq 0,05$) das demais formulações do planejamento, caracterizando-se por apresentar menor valor e, este, similar ao valor obtido para a Formulação Controle (Tabela 19). Os resultados obtidos neste trabalho foram superiores aos encontrados por Rapacci (1997), que ficaram na faixa de 0,52 a 0,73, similares aos resultados obtidos por Van Dender *et al.* (2003), $0,808 \pm 0,005$ e $0,987 \pm 0,049$, porém inferiores aos valores obtidos por Van Dender *et al.* (2005), $0,996 \pm 0,002$.

Com o objetivo de verificar se as variáveis estudadas (inulina e oligofructose) exerceram efeitos significativos sobre a resposta coesividade, foram calculados os efeitos, que estão apresentados na Tabela 27.

TABELA 27 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO COESIVIDADE PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO

	EFEITO	ERRO PADRÃO	T (3)	P – VALOR
MÉDIA	0,83	0,00	319,63	0,0000*
INULINA	0,01	0,01	2,43	0,1356
OLIGOFRUTOSE	0,02	0,01	4,35	0,0490*
INULINA X OLIGOFRUTOSE	0,01	0,01	1,34	0,3132

FONTE: O autor (2009).

NOTA: * $p \leq 0,05$.

Devido ao fato de que os efeitos foram significativos sobre a resposta estudada, foi calculado a ANOVA e os resultados estão na Tabela 28.

TABELA 28 - ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO COESIVIDADE PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F _{CALCULADO}
Regressão	0,00	3,00	0,00	40,14
Resíduos	0,00	3,00	0,00	
Total	0,00	6,00		

FONTE: O autor (2009).

NOTA: $F_{3;3;0,05} = 9,27$ ^a = soma de quadrado; ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

Devido ao fato de que o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} (Tabela 28) foi possível construir a superfície de resposta, que se encontra na FIGURA 09.

Observando-se os resultados obtidos na análise de efeitos (Tabela 27) e na superfície de resposta (FIGURA 09) pode-se verificar que a concentração de oligofrutose exerce efeito positivo significativo ($p \leq 0,05$) sobre o atributo coesividade, ou seja, o aumento na concentração de oligofrutose, dentro da faixa estudada, resulta no aumento da coesividade para as formulações simbióticas. Van Dender *et al.* (2005) verificaram, por sua vez, que a coesividade aumentou à medida que houve um aumento no teor de EST e de carboidratos totais (Tabela 17). No entanto, a adição de inulina não promoveu efeito significativo ($p > 0,05$) na resposta avaliada (coesividade), apesar deste efeito ser positivo. A adição de inulina em pó em mortadela convencional (com teor de gordura tradicional) não resultou em diferença significativa para coesividade entre os tratamentos, com diferentes níveis de inulina (2,5%; 5,0% e 7,5%) e o controle, sem adição de inulina (GARCIA; CÁCERES; SELGAS, 2006).

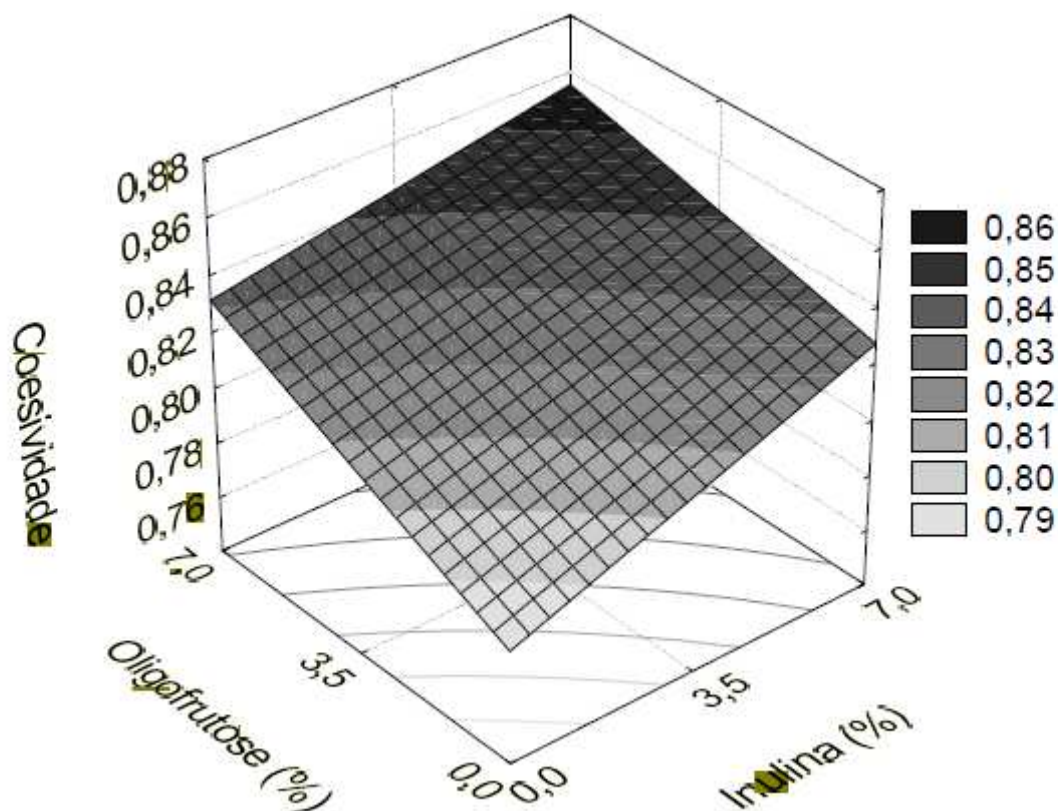


FIGURA 09 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA COESIVIDADE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INULINA (G/ 100 G) E DE OLIGOFRUTOSE (G/ 100 G) EM REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO

FONTE: O autor (2009).

Após 60 dias de fabricação, foi verificada redução no valor da coesividade para todas as formulações do planejamento, inclusive para a controle (Tabela 23). As Formulações 1 e 2 apresentaram os menores valores de coesividade ($p \leq 0,05$) quando comparadas as demais formulações do planejamento que não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância, sendo que estas apresentaram comportamento similar ao requeijão cremoso controle elaborado por Oliveira (2003).

Com o objetivo de avaliar se as variáveis estudadas (inulina e oligofrutose) exercem efeitos sobre a coesividade do requeijão cremoso

simbiótico com 60 dias, foi calculado a análise de efeitos que se encontra na Tabela 29.

TABELA 29 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO COESIVIDADE DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO

	EFEITO	ERRO PADRÃO	T (3)	P - VALOR
MÉDIA	0,72	0,00	264,01	0,0000*
INULINA	0,02	0,01	3,78	0,0634*
OLIGOFRUTOSE	0,04	0,01	6,62	0,0221*
INULINA X OLIGOFRUTOSE	0,05	0,01	8,54	0,0134*

FONTE: O autor (2009).

NOTA: * $p \leq 0,05$ e * $p \leq 0,10$.

Devido ao fato de que os efeitos foram significativos sobre a resposta estudada (Tabela 29), foi calculado a ANOVA e os resultados estão na Tabela 30.

TABELA 30 - ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO COESIVIDADE PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ^a	GL^b	QM^c	F_{CALCULADO}
Regressão	0,02	3,00	0,01	258,20
Resíduos	0,00	3,00	0,00	
Total	0,02	6,00		

FONTE: O autor (2009).

NOTA: $F_{3;3;0,05} = 9,27$ ^a = soma de quadrado; ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

Devido ao fato de que o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} (Tabela 30), foi possível construir a superfície de resposta, que se encontra na FIGURA 10.

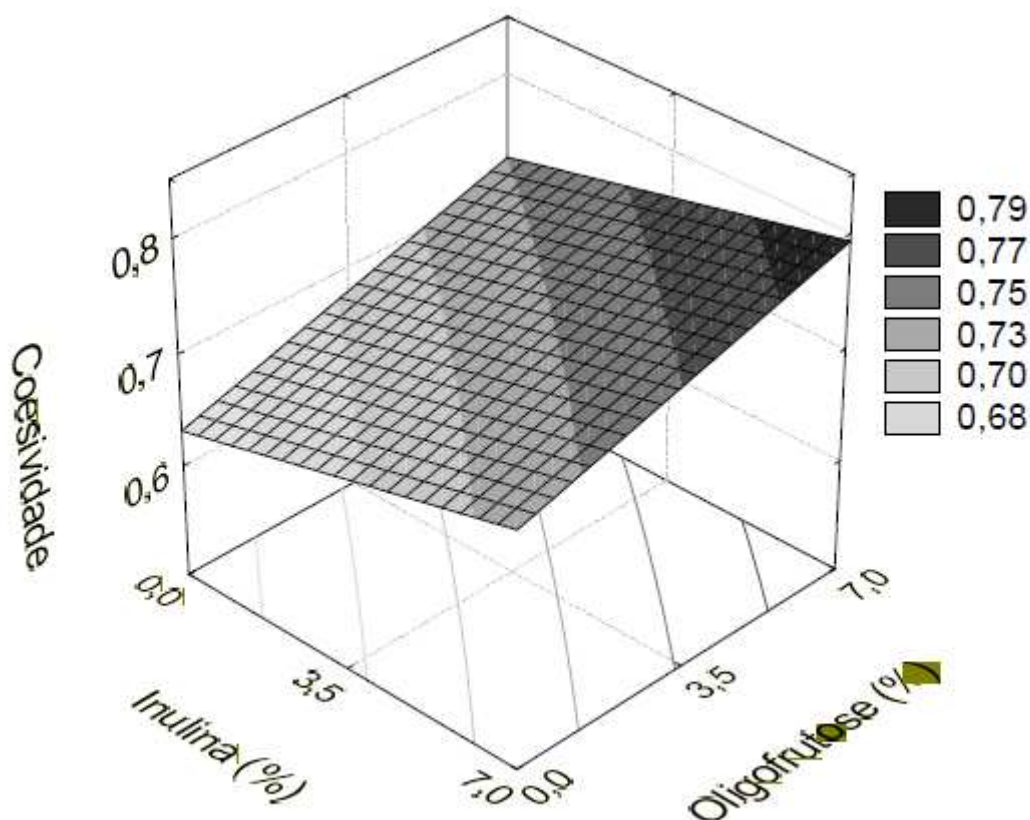


FIGURA 10 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA COESIVIDADE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INULINA (G/ 100 G) E DE OLIGOFRUTOSE (G/ 100 G) EM REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO

FONTE: O autor (2009).

Conforme os resultados da análise de efeitos (Tabela 29) e da superfície de resposta (FIGURA 10) pode-se observar que, dentro da faixa estudada (0 – 7 g/ 100 g) a inulina e a oligofrutose exercem efeito positivo significativo na resposta coesividade ao nível de 10% de probabilidade, ou seja, o aumento na concentração destes ingredientes prebióticos contribui para um aumento da coesividade do requeijão cremoso simbiótico. Comparativamente,

a oligofrutose teve efeito mais acentuado neste parâmetro quando comparada à inulina, já que este foi significativo ao nível de 5% de significância.

Similarmente aos resultados da Tabela 19, Buriti, Cardarelli e Saad (2008) verificaram redução da coesividade durante a vida útil de queijo fresco simbiótico elaborado pela adição de inulina e *L. paracasei*, mas não avaliaram o efeito desta variável sobre a coesividade durante a vida útil. Por sua vez, Koca e Metin (2004) observaram aumento significativo da coesividade para queijo Kasar adicionado de inulina e com teor reduzido de gordura.

De acordo com a Tabela 19, é possível verificar que para a elasticidade, as formulações do planejamento não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância, onde os valores se encontram entre 0,95 a 0,96, e aproximam-se do valor obtido para a Formulação Controle. Estes resultados foram inferiores ao valor determinado por Van Dender *et al.* (2005) para amostra comercial de requeijão cremoso ($0,996 \pm 0,002$). Resultados similares foram encontrados por Oliveira (2003) para requeijão cremoso e requeijão cremoso adicionado de transglutaminase.

Com o objetivo de verificar se as variáveis estudadas (inulina e oligofrutose) exercem efeito significativo sobre a elasticidade aos 3 dias de fabricação, foi calculado a análise de efeitos, que se encontra na Tabela 31

Através da Tabela 31 é possível verificar que ambos os prebióticos, inulina e oligofrutose, na faixa estudada, não exercem efeito significativo ao nível de 5% de significância no parâmetro avaliado (elasticidade).

TABELA 31 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ELASTICIDADE DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO

	EFEITO	ERRO PADRÃO	T (3)	P - VALOR
MÉDIA	0,95	0,00	1157,00	0,0000*
INULINA	0,01	0,00	3,61	0,0689
OLIGOFRUTOSE	0,01	0,00	3,00	0,0956
INULINA X OLIGOFRUTOSE	0,00	0,00	0,70	0,5607

FONTE: O autor (2009).

NOTA: * $p \leq 0,05$.

Porém, a análise de efeitos após 60 dias de fabricação foi significativa ($p \leq 0,05$) para a variável inulina sobre a resposta elasticidade, conforme apresentando na tabela abaixo (Tabela 32).

TABELA 32 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ELASTICIDADE DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO

	EFEITO	ERRO PADRÃO	T (3)	P - VALOR
MÉDIA	0,94	0,00	1376,71	0,0000*
INULINA	0,02	0,00	11,37	0,0076*
OLIGOFRUTOSE	-0,00	0,00	-1,94	0,1917
INULINA X OLIGOFRUTOSE	-0,00	0,00	-0,56	0,6348

FONTE: O autor (2009).

NOTA: * $p \leq 0,05$.

Devido ao fato de que os efeitos foram significativos sobre a resposta estudada (Tabela 32), foi calculado a ANOVA e os resultados estão na Tabela 33.

TABELA 33 - ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ELASTICIDADE PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F _{CALCULADO}
Regressão	0,00	3,00	0,00	83,57
Resíduos	0,00	3,00	0,00	
Total	0,00	6,00		

FONTE: O autor (2009).

NOTA: $F_{3;3;0,05} = 9,27$ ^a = soma de quadrado; ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

Devido ao fato de que o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} ao nível de 5% de significância (Tabela 33), foi possível construir a superfície de resposta, que se encontra na FIGURA 11.

Após os 60 dias de fabricação, as diferentes formulações do planejamento não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao tempo inicial (Tabela 19). No entanto, pela análise de efeitos (Tabela 32) e pela superfície de resposta (Figura 11) a inulina passou a exercer efeito positivo significativo ao nível de 5% de probabilidade, ou seja, a medida em que se aumenta a concentração de inulina aumenta-se a elasticidade das formulações. Por sua vez, Koca e Metin (2004) não verificaram aumento significativo da elasticidade em queijo Kashar adicionado de inulina como substituto de gordura.

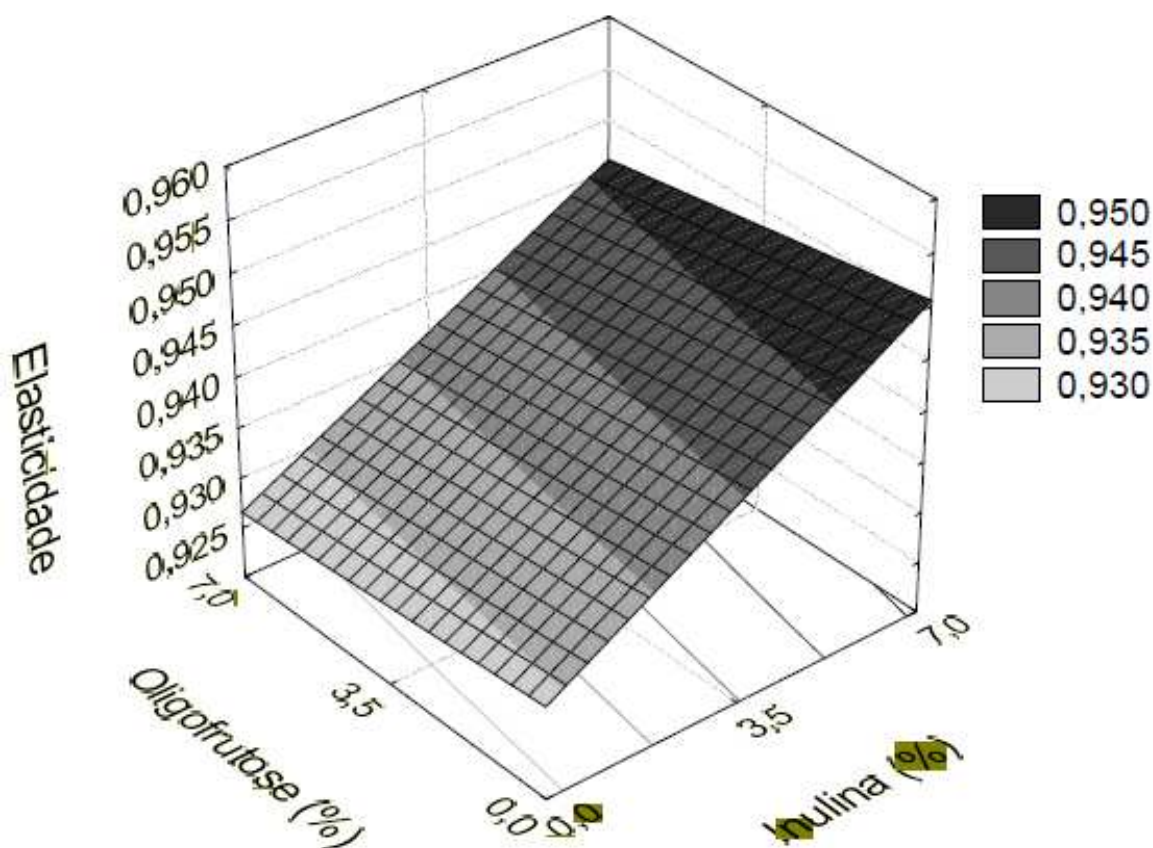


FIGURA 11 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ELASTICIDADE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INULINA (G/ 100 G) E DE OLIGOFRUTOSE (G/ 100 G) EM REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO

FONTE: O autor (2009).

De maneira geral, os mesmos parâmetros que influenciam a firmeza têm impactos também sobre a gomosidade, já que a energia necessária para desintegrar o alimento está relacionada à força necessária para comprimi-lo (CUNHA, 2007). De fato, como mostra a Tabela 19 para o terceiro dia de fabricação, os valores de gomosidade seguiram a tendência dos valores de firmeza, ou seja, a Formulação 01 diferiu significativamente das demais formulações do planejamento, apresentando um maior valor para este parâmetro ($p \leq 0,05$), porém comparativamente a Formulação Controle foi

menor (Tabela 23). Picolli (2006) obteve, para a formulação padrão, valor da ordem de 0,42, que mais se aproximou dos valores obtidos para as formulações com caráter simbiótico.

Com o objetivo de verificar se as variáveis estudadas (inulina e oligofrutose) exerceram efeitos significativos sobre a resposta gomosidade, foram calculados os efeitos, que estão apresentados na Tabela 34.

TABELA 34 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2² (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO GOMOSIDADE (N) PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 03 DIAS DE FABRICAÇÃO

	EFEITO	ERRO PADRÃO	T (3)	P - VALOR
MÉDIA	0,40	0,02	23,07	0,0019*
INULINA	-0,02	0,03	-0,76	0,5287
OLIGOFRUTOSE	-0,04	0,03	-1,05	0,4045
INULINA X OLIGOFRUTOSE	0,04	0,03	1,08	0,3929

FONTE: O autor (2009).

NOTA: * $p \leq 0,05$.

Como os efeitos não foram significativos sobre a resposta estudada, a inulina e a oligofrutose não interferem significativamente neste parâmetro aos três dias de fabricação ($p > 0,05$). Porém, é possível verificar que ambas as fibras prebióticas exercem efeito negativo, ou seja, um aumento na concentração destas fibras pode resultar na redução da gomosidade do produto, o que pode ser verificado na Tabela 19.

De acordo com Garcia, Cáceres e Selgas (2006), a gomosidade de mortadela foi dependente da forma como a inulina foi adicionada: em pó ou em gel. Quando em pó, somente a maior concentração avaliada (7,5%) contribuiu para um aumento da gomosidade, as demais concentrações (2,5% e 5,0%) foram similares ao controle. Porém, quando em gel, as amostras com 2,5% e 5,0% foram similares estatisticamente ao controle, contudo aquelas adicionadas de 7,5% apresentaram valores inferiores de gomosidade. Apesar

deste trabalho ter adicionado inulina em pó, o comportamento relativo à gomosidade foi mais próximo ao da adição na forma em gel, provavelmente pelo fato de que a quantidade de água utilizada na elaboração do requeijão cremoso possa ter contribuído para uma melhor dispersibilidade da inulina.

Ao avaliar os resultados obtidos após 60 dias de vida útil do requeijão cremoso simbiótico, é possível verificar que, em geral, há um aumento da gomosidade tanto para as formulações do planejamento quanto para a Formulação Controle (Tabela 19). A Formulação 01 diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) das demais formulações, apresentando maiores valores de gomosidade, porém inferior à Formulação Controle. Apesar da Formulação 02 ter apresentado menor valor de gomosidade que a Formulação 01, esta apresentou maiores valores que as demais formulações do planejamento ($p \leq 0,05$). Oliveira (2003) não verificou diferenças significativas para gomosidade em requeijão cremoso e requeijão cremoso adicionado de transglutaminase durante 20 dias de armazenamento.

Com o objetivo de verificar se as variáveis estudadas (inulina e oligofructose) interferem na gomosidade das diferentes formulações após 60 dias de fabricação, foi calculada a análise de efeitos, que se encontra na Tabela 35.

TABELA 35 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO GOMOSIDADE (N) PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO

	EFEITO	ERRO PADRÃO	T (3)	P - VALOR
MÉDIA	0,72	0,01	48,96	0,0004*
INULINA	-0,202	0,04	-5,24	0,0345*
OLIGOFRUTOSE	-0,39	0,04	-9,97	0,0099*
INULINA X OLIGOFRUTOSE	0,18	0,04	4,74	0,0417*

FONTE: O autor (2009).

NOTA: * $p \leq 0,05$.

Como os efeitos foram significativos sobre a resposta estudada, foi calculado a ANOVA e os resultados estão descritos na Tabela 36.

TABELA 36 - ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO GOMOSIDADE (N) PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F _{CALCULADO}
Regressão	0,25	3,00	0,08	84,14
Resíduos	0,00	3,00	0,00	
Total	0,25	6,00		

FONTE: O autor (2009).

NOTA; $F_{3;3;0,05} = 9,27$; ^a = soma de quadrado ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

Devido ao fato de que o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} ao nível de 5% de significância (Tabela 36), foi possível construir a superfície de resposta, que se encontra na FIGURA 12.

Os resultados obtidos na análise de efeitos (Tabela 35) e na superfície de resposta (FIGURA 12), indicam que a inulina e a oligofrutose exercem efeito negativo sobre a gomosidade do requeijão cremoso simbiótico aos 60 dias de fabricação visto haver diferença significativa de 5%, ou seja, um aumento da concentração de inulina e de oligofrutose dentro da faixa estudada (0 a 7 g/ 100 g) contribui para a redução da gomosidade.

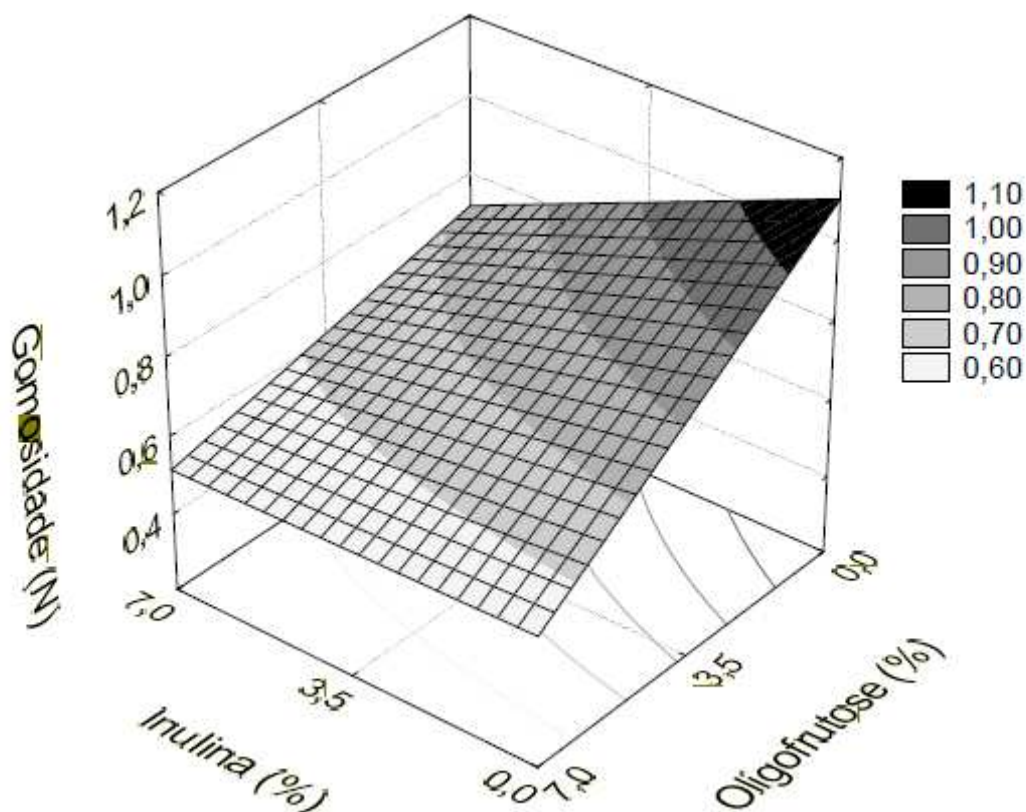


FIGURA 12 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA GOMOSIDADE (N) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INULINA (G/ 100 G) E DE OLIGOFRUTOSE (G/ 100 G) EM REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 60 DIAS DE FABRICAÇÃO

FONTE: O autor (2009).

4.4 QUANTIFICAÇÃO DOS PREBIÓTICOS

As concentrações de inulina (g/ 100 g) e de oligofrutose (g/ 100 g), nas diferentes formulações do planejamento, com 03 e 60 dias de armazenamento à temperatura de $5 \pm 1^\circ\text{C}$, encontram-se apresentadas na FIGURA 13.

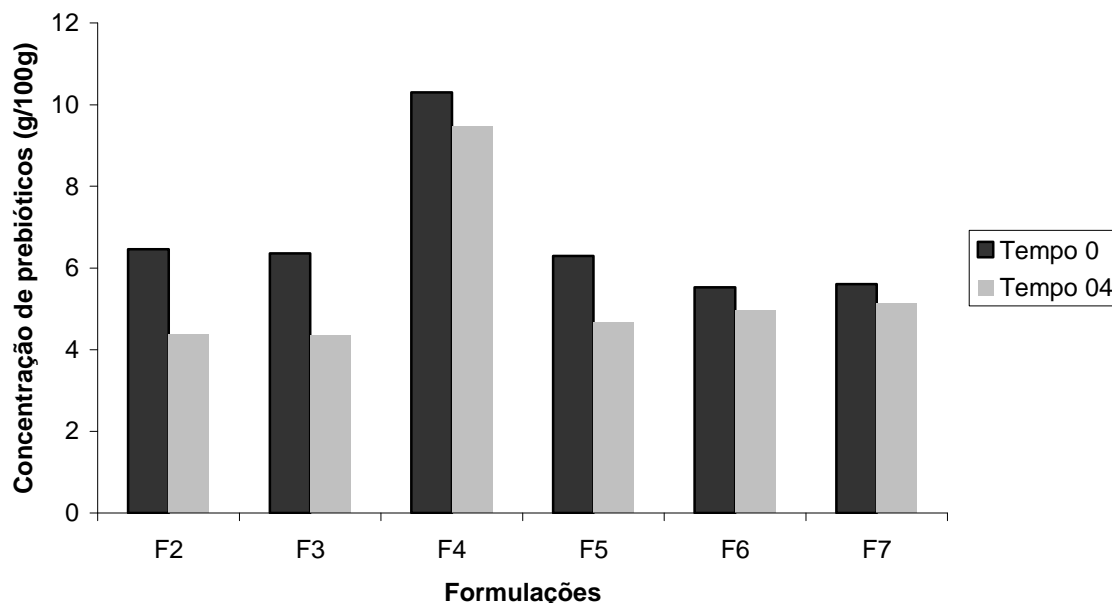


FIGURA 13 - CONCENTRAÇÃO DE PREBIÓTICOS (INULINA G/ 100 G E OLIGOFRUTOSE G/ 100 G) NAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO DURANTE ARMAZENAMENTO A $5 \pm 1^\circ\text{C}$

FONTE: O autor (2009).

NOTA: T0 = 1 dia de fabricação; T 04 = 60 dias após a fabricação; F2 = 7 g de inulina/ 100 g de requeijão cremoso; F3 = 7 g de oligofrutose/ 100 g de requeijão cremoso, F4 = 7 g de inulina + 7 g de oligofrutose/ 100 g de requeijão cremoso; F5, F6 e F7 = 3,5 g de inulina + 3,5 g de oligofrutose/ 100 g de requeijão cremoso.

Os valores obtidos para a inulina (Beneo™ GR) e oligofrutose (Beneo™ P95) foram de 91,3 g/ 100 g e 97,57 g/ 100 g. Levando-se em consideração estes dados, os valores iniciais de inulina e de oligofrutose detectados pelo método encontram-se próximos da concentração determinada pelo fabricante.

A concentração de inulina e de oligofrutose variou em função do tempo de armazenamento, onde para todas as formulações houve redução na concentração destes prebióticos. A percentagem de redução diferiu entre as formulações, onde as Formulações 02 e 03 apresentaram as maiores reduções das concentrações destes prebióticos (32% e 31,6%, respectivamente). Por sua vez, as Formulações 4, 6 e 7 apresentaram perdas semelhantes em

termos percentuais (8,16%, 10% e 8,38%, respectivamente). A Formulação 05 apresentou, ao contrário do esperado, uma perda superior em relação ao teor de inulina/ oligofrutose quando comparada às Formulações 06 e 07.

Poucos trabalhos têm avaliado a concentração inicial e final de inulina e/ ou oligofrutose em alimentos com apelo simbiótico. Comparativamente aos trabalhos desenvolvidos por Cardarelli *et al.* (2008), que avaliaram o efeito da inulina e da oligofrutose na qualidade sensorial e na enumeração de microrganismos probióticos (*L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis*) em queijo *Petit Suisse* simbiótico, e Buriti *et al.* (2007), que avaliaram o efeito da inulina sobre as características físico-químicas e microbiológicas de queijo cremoso fresco simbiótico, a redução do teor de inulina e/ ou de oligofrutose neste trabalho ao longo do armazenamento foi mais significativa (Figura 12).

Atualmente, é reconhecida a atividade bifidogênica que ambas, inulina e oligofrutose, exercem sobre espécies de *Bifidobacterium in vitro* (ROSSI *et al.*, 2005; VAN DE WIELE *et al.*, 2007; HERNOT *et al.*, 2009) e *in vivo* (JUZSKIEWSKI; ZDUNCZYK, 2004; CASIRAGHI *et al.*, 2007). E levando-se em consideração que a inulina e oligofrutose são relativamente estáveis na faixa de pH de 5,5 – 8,5 (ROBERFROID, 2005), a probabilidade de que o decréscimo da concentração dos prebióticos deva-se mais ao efeito bifidogênico do que a hidrólise ácida é possível.

Porém, ainda não há um consenso entre os pesquisadores no que diz respeito a uma concentração mínima para promover melhor desenvolvimento dos microrganismos probióticos (CARDARELLI *et al.*, 2008).

Em relação à oligofrutose, doses na faixa de 4 a 15 g/ dia têm sido recomendadas na literatura como efetivas na ação bifidogênica (ZIEMER; GIBSON, 1998; RAO, 2001; MANNING; GIBSON, 2004;). Kolida e Gibson (2007) sugerem, em seu artigo de revisão, consumo diário de 5 a 8 gramas de inulina para que exerça efeito benéfico desejado. Por sua vez, Losada e Olleros (2002) sugerem que doses entre 4-20 g/ dia de fibras prebióticas têm demonstrado eficácia, porém doses maiores que 20 g/ dia podem induzir a alguns efeitos indesejáveis, como flatulência e desconforto abdominal. Com base no exposto, todas as formulações de requeijão cremoso simbiótico do

planejamento apresentaram valores de inulina e/ ou oligofrutose suficientes para que possam ser considerados prebióticos durante toda a vida útil dos mesmos, desde que consumido diariamente 100g deste produto. Porém, para constar na rotulagem do produto alegação de propriedade funcional, o mesmo deve apresentar 3 g de inulina e/ ou frutooligossacarídeos por porção do alimento pronto para o consumo, segundo lista atualizada de Alegações de Propriedade Funcional pela ANVISA (2008). Segundo a Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003, da ANVISA, que aprova Regulamento Técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional, a porção recomendada para consumo de requeijão é de 30 g. Desta forma, a Formulação 4 atenderia ao especificado pela legislação durante a vida útil e poderia receber na rotulagem a alegação de propriedade funcional. A Formulação 4 possui, ainda, como vantagem o fato de ser composta pelos dois prebióticos, pois segundo Biedrzycka e Bielecka (2004) a presença de uma mistura destes prebióticos é vantajosa sob o ponto de vista fisiológico, já que a oligofrutose parece exercer efeito bifidogênico na porção inicial do cólon intestinal e a inulina na porção distal, o que poderia contribuir para a persistência e a eficiência prolongada no trato digestório. As demais formulações, inicialmente, necessitariam da ingestão de duas porções por dia para atingir a concentração determinada pela legislação. Porém, ao final da vida útil, esta ingestão deveria ser aumentada para de três porções diárias a fim de atender ao preconizado pela legislação.

4.5 ANÁLISE DE PH E DE ACIDEZ TITULÁVEL, EXPRESSA EM PERCENTAGEM DE ÁCIDO LÁTICO, DURANTE A VIDA ÚTIL DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO

O resultado referente aos valores de pH para as diferentes formulações do planejamento e para a Formulação Controle encontra-se na Tabela 37.

TABELA 37 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS) COM A RESPOSTA PH PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO ARMAZENADAS A TEMPERATURA DE REFRIGERAÇÃO ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) DURANTE 60 DIAS

F ¹	X ₁ ²	X ₂ ³	TEMPO ⁴ 0	TEMPO ⁴ 1	TEMPO ⁴ 2	TEMPO ⁴ 3	TEMPO ⁴ 4
1	-1 (0)	-1 (0)	5,9 ± 0,1	5,8 ± 0,2	5,8 ± 0,1	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,2
2	+1 (0)	-1 (7)	5,9 ± 0,1	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,3	5,5 ± 0,1	5,5 ± 0,1
3	-1 (7)	+1 (0)	5,9 ± 0,1	5,7 ± 0,2	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,1
4	+1 (7)	+1 (7)	5,9 ± 0,1	5,7 ± 0,2	5,7 ± 0,11	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,1
5	0 (3,5)	0 (3,5)	5,9 ± 0,1	5,7 ± 0,3	5,7 ± 0,2	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,1
6	0 (3,5)	0 (3,5)	5,9 ± 0,1	5,7 ± 0,2	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,1
7	0 (3,5)	0 (3,5)	5,9 ± 0,1	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,1	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,1
FC ⁵	-	-	6,2 ± 0,1	6,1 ± 0,1	6,2 ± 0,1	6,1 ± 0,1	6,1 ± 0,1

FONTE: O autor (2009).

NOTA: ¹ F: formulação; ² concentração de inulina (g/ 100 g de requeijão cremoso simbiótico); ³ concentração de oligofrutose (g/ 100 g de requeijão cremoso); ⁴ Tempo 0 = 03 dias após a fabricação; Tempo 1 = 15 dias após a fabricação; Tempo 2 = 30 dias após a fabricação; Tempo 3 = 45 dias após a fabricação e Tempo 4 = 60 dias após a fabricação; ⁵ Formulação controle.

Como pode ser observado, os valores de pH (Tabela 37) não diferem significativamente ao nível de 5% de significância entre os tratamentos e, para cada tratamento, não diferem em relação ao tempo ($p > 0,05$). Porém, ao se analisar os resultados é possível verificar uma leve redução do pH no Tempo 02 para as Formulações 02 e 03. Cardarelli *et al.* (2008) verificaram uma redução significativa para os valores de pH durante o armazenamento das diferentes formulações de queijo *Petit Suisse* simbiótico.

O resultado referente aos valores de acidez, expresso em ácido láctico (%m/m), para as diferentes formulações do planejamento e para a Formulação Controle encontra-se na Tabela 38.

Por sua vez, os valores de acidez não diferem entre os tratamentos ($p > 0,05$), mas as Formulações 02 e 03 apresentam um aumento significativo da acidez ($p \leq 0,05$) no Tempo 02 em relação ao Tempo 01, condizente com a redução do pH acima mencionada.

O *Bifidobacterium animalis* subps. *lactis* Bb-12 é capaz de produzir ácidos orgânicos, como os ácidos acético e lático, na proporção de 3:2, respectivamente (OSTLIE; HELLAND; NARVAUS, 2003), o que pode ter colaborado para o aumento, apesar de não significativo, do pH e da acidez para as Formulações 02 e 03.

TABELA 38 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2², COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS) COM A RESPOSTA ACIDEZ, EXPRESSA EM ÁCIDO LÁTICO (% M/M), PARA CADA UMA DAS FORMULAÇÕES REFERENTES AO REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO ARMAZENADAS A TEMPERATURA DE REFRIGERAÇÃO (5 ± 1°C) DURANTE 60 DIAS

F ¹	x ₁ ²	x ₂ ³	TEMPO ⁴ 0	TEMPO ⁴ 1	TEMPO ⁴ 2	TEMPO ⁴ 3	TEMPO ⁴ 4
1	-1 (0)	-1 (0)	0,34 ± 0,02 ^{Aa}	0,32 ± 0,03 ^{Aa}	0,33 ± 0,02 ^{A a}	0,40 ± 0,02 ^{A a}	0,37 ± 0,01 ^{Aa}
2	+1 (0)	-1 (7)	0,27 ± 0,03 ^{Aa}	0,32 ± 0,07 ^{Aa}	0,37 ± 0,02 ^{A b}	0,37 ± 0,03 ^{A ab}	0,37 ± 0,05 ^{Aab}
3	-1 (7)	+1 (0)	0,30 ± 0,06 ^{Aa}	0,35 ± 0,02 ^{Aa}	0,42 ± 0,08 ^{A b}	0,38 ± 0,04 ^{A ab}	0,35 ± 0,06 ^{A ab}
4	+1 (7)	+1 (7)	0,30 ± 0,03 ^{Aa}	0,32 ± 0,02 ^{Aa}	0,38 ± 0,05 ^{Aa}	0,35 ± 0,05 ^{Aa}	0,35 ± 0,06 ^{Aa}
5	0 (3,5)	0 (3,5)	0,30 ± 0,05 ^{Aa}	0,33 ± 0,01 ^{Aa}	0,38 ± 0,08 ^{Aa}	0,32 ± 0,02 ^{Aa}	0,34 ± 0,03 ^{Aa}
6	0 (3,5)	0 (3,5)	0,29 ± 0,01 ^{Aa}	0,34 ± 0,03 ^{Aab}	0,39 ± 0,08 ^{Ab}	0,35 ± 0,05 ^{Aab}	0,37 ± 0,04 ^{Aab}
7	0 (3,5)	0 (3,5)	0,32 ± 0,05 ^{Aa}	0,34 ± 0,03 ^{Aa}	0,40 ± 0,06 ^{Aa}	0,39 ± 0,05 ^{Aa}	0,42 ± 0,10 ^{Aa}
FC ⁵			0,30 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,24 ± 0,04

FONTE: O autor (2009).

NOTA: ^A Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa entre as formulações; ^a Médias seguidas por letras minúsculas iguais, na mesma linha, indicam não haver diferença significativa entre os tempos analisados para a mesma formulação; ¹ F: formulação; ² concentração de inulina (g/ 100 g de requeijão cremoso simbiótico); ³ concentração de oligofrutose (g/ 100 g de requeijão cremoso); ⁴ Tempo 0 = 03 dias após a fabricação; Tempo 1 = 15 dias após a fabricação; Tempo 2 = 30 dias após a fabricação; Tempo 3 = 45 dias após a fabricação e Tempo 4 = 60 dias após a fabricação; ⁵ Formulação controle.

4.6 CONTAGEM DAS BACTÉRIAS PROBIÓTICAS

Os valores referentes à enumeração de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 das formulações do planejamento, no Tempo 0 e nos diferentes tempos de armazenamento (1, 2, 3 e 4), encontram-se descritos na Tabela 39.

De acordo com os resultados obtidos, as formulações do planejamento não diferem significativamente entre si em relação ao valor inicial de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 ($p \leq 0,05$), apresentando valores superiores a $6 \log_{10}$ UFC/g (Tabela 40).

Levando-se em consideração a concentração necessária a ser ingerida diariamente para que o produto probiótico exerça seus efeitos benéficos e o estipulado por Gomes e Malcata (1999), que preconizam que a ingestão diária seria conseguida ao ingerir 100 g de um produto contendo entre 10^6 a 10^7 UFC/g ou mL, todas as formulações apresentam valores superiores ao sugerido pelos autores durante armazenamento sob refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) por 60 dias (Tabela 39).

Porém, a partir de 2008, a ANVISA, através da Lista de Alegações de Propriedade Funcional, determinou que um produto para receber a alegação de propriedade funcional relacionada a característica probiótica deve apresentar quantidade mínima viável para estes microrganismos na faixa de 8 a $9 \log_{10}$ UFC/ g ou mL na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Com base na Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003, da ANVISA, a porção recomendada para requeijão é de 30 g. Desta forma, ao consumir uma porção do requeijão cremoso simbiótico desenvolvido no trabalho estaria consumindo cerca de $7 \log_{10}$ UFC/ g. Desta forma, o produto não poderia receber a alegação de propriedade funcional. Porém, a ingestão de três porções diárias atenderia a concentração sugerida para exercer efeito benéfico.

TABELA 39 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2², COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS) COM A RESPOSTA ENUMERAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB-12 (LOG10 UFC/ G) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO ARMAZENADAS A TEMPERATURA DE REFRIGERAÇÃO (5 ± 1°C) DURANTE 60 DIAS

FORMULAÇÃO	x ₁ ¹	x ₂ ²	Tempo ³ 0	Tempo ³ 1	Tempo ³ 2	Tempo ³ 3	Tempo ³ 4
1	-1 (0)	-1 (0)	6,5 ± 0,1 ^{Aa}	7,4 ± 0,1 ^{Ab}	7,0 ± 0,1 ^{Ac}	6,2 ± 0,2 ^{Aa}	6,2 ± 0,2 ^{Aa}
2	+1 (7)	-1 (0)	6,5 ± 0,2 ^{Aa}	7,4 ± 0,1 ^{Ab}	7,5 ± 0,1 ^{BCb}	7,4 ± 0,0 ^{Bb}	7,6 ± 0,2 ^{Bb}
3	-1 (0)	+1 (7)	6,6 ± 0,3 ^{Aa}	7,4 ± 0,0 ^{Ab}	7,4 ± 0,0 ^{BCb}	7,0 ± 0,1 ^{Cac}	7,1 ± 0,0 ^{Cc}
4	+1 (7)	+1 (7)	6,6 ± 0,0 ^{Aa}	7,2 ± 0,2 ^{ACb}	7,3 ± 0,2 ^{ACDb}	6,8 ± 0,1 ^{Da}	6,7 ± 0,1 ^{Da}
5	0 (3,5)	0 (3,5)	6,7 ± 0,1 ^{Aa}	6,8 ± 0,0 ^{Ba}	6,9 ± 0,0 ^{Aa}	7,1 ± 0,1 ^{Cb}	7,1 ± 0,1 ^{Cb}
6	0 (3,5)	0 (3,5)	6,6 ± 0,1 ^{Aa}	6,9 ± 0,1 ^{BCb}	7,0 ± 0,1 ^{ACb}	7,3 ± 0,1 ^{BCc}	7,2 ± 0,0 ^{Cbc}
7	0 (3,5)	0 (3,5)	6,6 ± 0,0 ^{Aa}	7,0 ± 0,0 ^{BCb}	7,0 ± 0,1 ^{ACb}	7,4 ± 0,0 ^{Bc}	7,2 ± 0,2 ^{BCbc}

FONTE: O autor (2009).

NOTA: ^A Médias maiúsculas seguidas por letras iguais, na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa entre as formulações (p > 0,05); ^a Médias minúsculas seguidas por letras iguais, na mesma linha, indicam não haver diferença significativa entre os tempos analisados para a mesma formulação (p > 0,05); ¹ concentração de inulina (g/ 100 g de requeijão cremoso simbiótico); ² concentração de oligofrutose (g/ 100 g de requeijão cremoso); ³ Tempo 0 = 03 dias após a fabricação; Tempo 1 = 15 dias após a fabricação; Tempo 2 = 30 dias após a fabricação; Tempo 3 = 45 dias após a fabricação e Tempo 4 = 60 dias após a fabricação.

O fato de se ter trabalhado com apenas um microrganismo probiótico pode ter contribuído para a viabilidade do *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 durante a vida útil do requeijão cremoso simbiótico, pois Oliveira *et al.* (2009) sugerem que, apesar das vantagens em termos de qualidade do produto, o uso de mais de um microrganismo em misturas complexas resultam na redução significativa de todos os microrganismos como consequência da maior competição pelo mesmo substrato. Ainda, o fato de não ter havido diferenças significativas para os valores de pH entre as formulações e, para cada formulação dentro do tempo avaliado ($p > 0,05$) (Tabela 37), permanecendo este superior a 5,0 poderia ter exercido, também, um efeito benéfico sobre a viabilidade do microrganismo em estudo, já que Shah *et al.* (1995) observaram rápido declínio de microrganismos probióticos em leites fermentados à medida que os valores de pH reduziram.

Ao contrário do resultado obtido por Daigle *et al.* (1999), que ao avaliarem a produção de queijo Cheddar probiótico usando creme enriquecido e fermentado por *Bifidobacterium infantis* não observaram diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade durante 12 semanas de estocagem, onde os tratamentos permaneceram com valores finais acima de $6 \log_{10}$ UFC/ g, neste trabalho todos os tratamentos diferem significativamente entre si ao longo do armazenamento ($p \leq 0,05$) e cada tratamento apresentou um comportamento frente à resposta estudada (Tabela 33).

Já Philips, Kailasapathy e Tran (2006), ao avaliarem a viabilidade de queijo Cheddar como carreador de *Bifidobacterium* Bb-12, observaram aumento na contagem deste microrganismo até a 15ª semana de estocagem; a partir desta data houve redução no número de microrganismos viáveis, porém permaneceram com contagem superior a 10^8 UFC/ g.

Aos 15 dias de armazenamento (Tempo 01), houve um aumento da população do probiótico em estudo para todas as formulações (Tabela 33). Porém, este aumento foi maior para as Formulações 01, 02, 03 e 04, o que fez com que estas fossem estatisticamente diferentes das demais formulações ($p \leq 0,05$).

Com o objetivo de avaliar se as variáveis estudadas inulina e oligofrutose exercem efeito significativo sobre a resposta (enumeração de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12), aos 15 dias de fabricação, foi calculado a análise de efeitos e os resultados estão na Tabela 40.

Pelos resultados obtidos (Tabela 40), as variáveis estudadas (inulina e oligofrutose) não exercem efeito significativo ao nível de 5% de significância. Porém, é possível verificar que um aumento na concentração de oligofrutose contribui para um aumento no número de microrganismos probióticos, ao passo que para inulina o aumento contribui para a redução da enumeração de probiótico.

TABELA 40 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2² (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ENUMERAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB-12 (LOG10 UFC/ G) PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 15 DIAS DE FABRICAÇÃO

	EFEITO	ERRO PADRÃO	T (3)	P - VALOR
MÉDIA	7,3	0,1	60,9	0,0000*
INULINA	-0,1	0,2	-0,2	0,8206
OLIGOFRUTOSE	0,2	0,2	1,0	0,3932
INULINA X OLIGOFRUTOSE	-0,4	0,2	-1,8	0,1696

FONTE: O autor (2009).

NOTA: * $p \leq 0,05$.

Aos 30 dias de fabricação (Tempo 02), a Formulação 01 apresentou uma queda no número de microrganismos probióticos, não diferindo significativamente das formulações 05, 06 e 07 ($p > 0,05$). As Formulações 2, 3 e 4 apresentaram um pequeno aumento, porém não significativo ($p > 0,05$), mas continuaram a ter maior contagem que as demais formulações ($p \leq 0,05$).

Com o objetivo de avaliar se os prebióticos, inulina e oligofrutose, exercem efeito significativo sobre a enumeração do microrganismo probiótico

em estudo, foi realizada a análise de efeitos referente ao 30º dia de fabricação e esta se encontra descrita na Tabela 41.

TABELA 41 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ENUMERAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB-12 (LOG10 UFC/ G) PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 30 DIAS DE FABRICAÇÃO

	EFEITO	ERRO PADRÃO	T (3)	P - VALOR
MÉDIA	7,3	0,0	314,2	0,0000*
INULINA	0,2	0,0	4,6	0,0190*
OLIGOFRUTOSE	0,1	0,0	2,5	0,0890*
INULINA X OLIGOFRUTOSE	-0,3	0,0	-6,7	0,0067*

FONTE: O autor (2009).

NOTA: * $p \leq 0,05$ e * $p \leq 0,10$.

Como os efeitos foram significativos sobre a resposta estudada, foi calculado a ANOVA e os resultados estão descritos na Tabela 42.

TABELA 42 - ANOVA DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ENUMERAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB-12 (LOG10 UFC/ G) PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 30 DIAS DE FABRICAÇÃO

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ^a	GL^b	QM^c	F_{CALCULADO}
Regressão	0,3	3,0	0,1	41,1
Resíduos	0,0	3,0	0,0	
Total	0,3	6,0		

FONTE: O autor (2009).

NOTA: $F_{3;3;0,05} = 9,27$; ^a = soma de quadrado; ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

Devido ao fato de que o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} ao nível de 5% de significância (Tabela 42), foi possível construir a superfície de resposta, que se encontra na FIGURA 14.

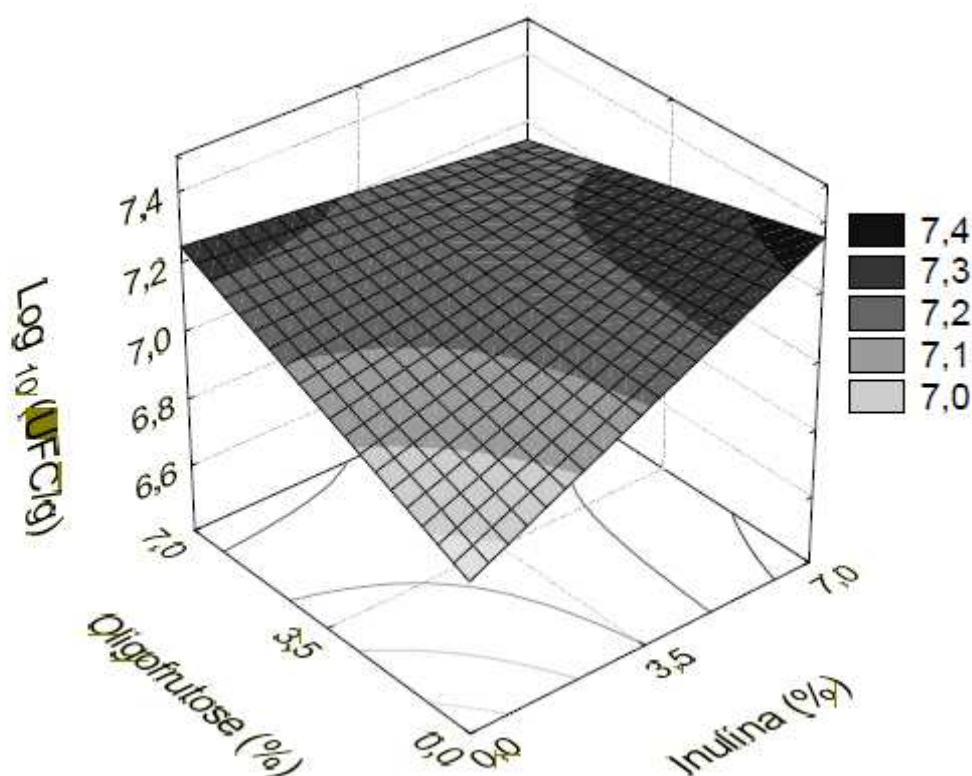


FIGURA 14 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ENUMERAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB-12 (LOG10 UFC/ G) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INULINA (G/ 100 G) E DE OLIGOFRUTOSE (G/ 100 G) PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO COM 30 DIAS DE FABRICAÇÃO

FONTE: O autor (2009).

De acordo com os resultados obtidos na análise de efeitos (Tabela 41) e na superfície de resposta (FIGURA 14) é possível observar que ambas, inulina e oligofrutose, nas concentrações avaliadas no experimento (0 a 7 g/ 100 g)

exercem efeito positivo significativo ($p \leq 0,10$), ou seja, um aumento nas concentrações de ambos os prebióticos promove um aumento na enumeração do micrororganismo probiótico no Tempo 2.

Este resultado pode ainda ser reforçado pelo fato de que para as Formulações 02 e 03 também houve um aumento significativo da acidez no Tempo 02 (Tabela 38). Ainda, apesar de não se ter determinado inulina e oligofrutose em intervalos de tempo durante a vida útil das formulações de requeijão cremoso simbiótico, foi verificado no final do período de fabricação redução nos valores destes prebióticos para as Formulações 02 e 03 mais significativas que para as demais formulações (FIGURA 13).

Vernazza, Gibson e Rastall (2006), ao avaliarem *in vitro* a utilização de frutanas com diferentes graus de polimerização por diferentes espécies de bifidobactérias, verificaram que *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 era capaz de utilizar oligofrutose e inulina com grau de polimerização 10, mas não inulina com grau de polimerização maior que 23. Neste trabalho foi empregado oligofrutose com grau de polimerização entre 2-8 (Beneo™ P95) e inulina com grau de polimerização entre 2-60 (Beneo™ GR), ou seja, uma mistura de oligo e polissacarídios. Pode ser por isso que, ao avaliar o efeito individual de cada prebiótico, a inulina apresentou efeito positivo com maior significância ($p \leq 0,05$) do que a oligofrutose ($p \leq 0,10$) sobre a enumeração do probiótico.

Aos 45 dias de fabricação, a Formulação 01, 03 e 04 apresentaram queda significativa na concentração de microrganismos em relação ao Tempo 02, onde a Formulação 01 apresentou a menor concentração deste microrganismo ($p \leq 0,05$). A Formulação 02, apesar de apresentar uma ligeira queda na enumeração do probiótico, não foi significativa ($p > 0,05$), aproximando-se das concentrações apresentadas pelas Formulações 05, 06 e 07, que apresentaram aumento na enumeração de bifidobactéria em relação ao tempo anterior ($p \leq 0,05$) (Tabela 39).

Por sua vez, no final da vida útil (Tempo 04), nenhuma das formulações do planejamento apresentaram redução significativa do número de microrganismos em relação ao Tempo 03 ($p > 0,05$); porém, a Formulações 02

apresentou os valores mais elevados de *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* Bb-12 ao final da vida útil (Tabela 39).

Com o objetivo de verificar se a inulina e a oligofrutose exercem efeitos significativos sobre a enumeração do microrganismo probiótico a partir do 45º dia de fabricação, foi calculado a análise de efeitos, que se encontra na Tabela 43.

TABELA 43 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2² (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA O ATRIBUTO ENUMERAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB-12 (LOG10 UFC/ G) PARA REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO NOS TEMPOS 03 E 04

		EFEITO	ERRO PADRÃO	T (3)	P - VALOR
TEMPO 03	Média	7,1	0,2	28,8	0,0000*
	Inulina	0,1	0,5	0,2	0,8471
	Oligofrutose	-0,3	0,5	-0,6	0,5895
	Inulina x Oligofrutose	-0,3	0,5	-0,6	0,5743
TEMPO 04	Média	7,1	0,2	32,7	0,0001*
	Inulina	0,1	0,4	0,3	0,7649
	Oligofrutose	-0,4	0,4	-0,8	0,4708
	Inulina x Oligofrutose	-0,5	0,4	-1,2	0,2974

FONTE: O autor (2009).

NOTA: * $p \leq 0,05$.

Ao analisar a tabela de efeitos (Tabela 43) é possível verificar que nem a inulina nem a oligofrutose apresentam efeito significativo ao nível de 5% de significância sobre a enumeração de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 aos 45 e 60 dias de fabricação. Porém, ao analisar somente os efeitos, é possível verificar que a partir do 45º dia, a inulina continua a exercer efeito positivo significativo, ou seja, nas concentrações analisadas, o aumento na concentração de inulina aumenta o número de microrganismos probióticos; porém, a partir deste mesmo tempo (Tempo 3), a oligofrutose passa a exercer

efeito negativo, ou seja, um aumento na concentração deste ingrediente na faixa estudada contribui para o menor número de microrganismos probióticos viáveis. Este comportamento se mantém até o final da vida útil do produto (60 dias). Desta forma, a manutenção da viabilidade do probiótico no requeijão cremoso deve-se provavelmente mais à presença de inulina do que de oligofrutose. Segundo Pasephool e Sherkat (2009) o mecanismo pelo qual a inulina confere viabilidade ao microrganismo probiótico durante a estocagem sob refrigeração ainda não está completamente claro, podendo ser devido ao efeito bifidogênico da inulina ou pela proteção das células microbianas de injúrias promovida pela acidez do produto.

Em geral, as formulações do planejamento adicionadas de inulina e de oligofrutose apresentaram no final da vida útil maior contagem de bifidobactéria do que Formulação 01 (Tabela 40). Capela, Hay e Shah (2006) também observaram manutenção da viabilidade de microrganismos probióticos durante a vida útil de iogurte adicionado de oligofrutose e inulina. Akalin e Eresir (2008), ao avaliarem o efeito da inulina (grau de polimerização maior que 20) e da oligofrutose (grau de polimerização menor que 20) sobre a vida útil de sorvete adicionado de *L. acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, verificaram uma maior enumeração dos microrganismos probióticos para o tratamento adicionado de oligofrutose comparativamente ao adicionado de inulina em todos os tempos avaliados (30, 60 e 90 dias). Cardarelli *et al.* (2008), apesar de terem observado redução da viabilidade dos microrganismos *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em queijo *Petit Suisse* durante os 28 dias de armazenamento, conseguiram obter queijos com contagem superior a $7 \log_{10}$ UFC/ g de produto.

4.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

O requeijão, por apresentar um alto valor nutricional, devido ao seu teor de proteínas, lipídeos, carboidratos e sais minerais, pode propiciar condições de desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (CHAGAS e SANTOS, 2001).

Visando avaliar a segurança dos provadores para a análise sensorial, análises microbiológicas das formulações do planejamento e para a Formulação Controle foram realizadas e os resultados estão descritos na Tabela 44.

TABELA 44 - RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE COLIFORMES A 35°C, 45°C E ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA PARA AS DIFERENTES FORMULAÇÕES DO PLANEJAMENTO E PARA A FORMULAÇÃO CONTROLE DO REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO*

FORMULAÇÕES	COLIFORMES A 35°C (NMP/G)	COLIFORMES A 45°C (NMP/G)	ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA
F1 **INUL 0%/ OLIGO 0%	<3,0	<3,0	<100
F2 **INUL 7%/ OLIGO 0%	<3,0	<3,0	<100
F3 **INUL 0%/ OLIGO 7%	5	5	<100
F4 **INUL 7%/ OLIGO 7%	4	4	< 100
F5 **INUL 3,5%/ OLIGO 3,5%	<3,0	<3,0	<100
F6 **INUL 3,5%/ OLIGO 3,5%	4	4	< 100
F7 **INUL 3,5%/ OLIGO 3,5%	<3,0	<3,0	<100
FC¹	<3,0	<3,0	<100

Fonte: O autor (2009).

NOTA: * Média de 03 (três) repetições; **As siglas INUL e OLIGO indicam, respectivamente, as porcentagens de inulina e oligofrutose utilizadas em cada tratamento; ¹FC = Formulação controle.

No trabalho, as formulações 3, 4 e 6 apresentaram valores superiores às demais para coliformes 35°C e 45°C (Tabela 44), porém dentro do limite estabelecido pela legislação para requeijão cremoso que é de 10 NMP/ g (BRASIL, 1997). Resultados semelhantes foram encontrados por Mendes (2006) ao avaliar a qualidade de amostras de requeijão cremoso comercializados na região metropolitana do Recife, onde todas as amostras apresentaram Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes dentro dos padrões estabelecidos pela legislação. Por outro lado, Sousa *et al.* (2002) constataram a presença de coliformes totais em 42,8% (3) e coliformes fecais em 28,6% (2) das amostras de requeijão analisadas.

Em relação à análise de estafilococos coagulase positiva (Tabela 44), não foi detectada a presença deste grupo de microrganismo, estando, portanto, de acordo com a legislação vigente para requeijão cremoso (BRASIL, 1997). Resultados semelhantes foram encontrados por Souza *et al.* (2002), onde na análise de sete diferentes marcas de requeijão comercializado na Ilha de Marajó não foi detectada a presença de *Staphylococcus aureus* em nenhuma das amostras analisadas, sendo este grupo de extrema importância em alimentos devido sua capacidade de produzir enterotoxinas.

4.8 ANÁLISE SENSORIAL

No desenvolvimento de alimentos com propriedades funcionais, tanto a aceitabilidade destes produtos quanto a intenção de compra por parte dos consumidores têm sido correlacionados com inúmeros fatores e avaliados por estudos descritos na literatura (WANSINK; WESTGREN; CHENEY, 2005; NIVA, 2007; HAILU *et al.*, 2008; SUN, 2008). Dentre os fatores de relevância, destaca-se o perfil sócio-demográfico, em especial o sexo, grau de escolaridade e idade (ARES; GÁMBARO, 2007).

Frente ao acima exposto, o perfil sócio-demográfico dos provadores que constituíram o painel sensorial encontra-se descrito na Tabela 45.

Apesar de se ter utilizado como critério de seleção a familiaridade com o produto, a frequência de consumo foi bastante variada, onde 13% dos provadores consumiam diariamente este produto, 37% uma vez por semana, 21% uma vez por mês e 21% raramente, apesar de apreciá-lo.

TABELA 45 - PERFIL SÓCIO-DEMOGRÁFICO DOS PROVADORES SELECIONADOS PARA A ANÁLISE SENSORIAL DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO*

CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS (%)
SEXO	Feminino = 64 Masculino = 36
GRAU DE ESCOLARIDADE	1º grau incompleto= 0 1º grau completo= 0 2º grau incompleto= 14 2º grau completo = 5 3º grau incompleto= 52 3º grau completo= 9 Superior ao 3º grau= 20
IDADE	18 – 25 anos = 66 26 – 35 anos = 15 36 – 46 anos = 12 acima de 46 anos = 7

FONTE: O autor (2009).

NOTA: * Referente a 84 provadores não treinados.

Quando perguntado aos provadores se eles comprariam um requeijão cremoso com propriedade funcional, 96% dos entrevistados disseram que sim. Segundo Crowley *et al.* (2002), quando há expectativa de benefícios para a saúde há um aumento na disposição para compra e consumo de alimentos. Alguns fatores podem ter contribuído para a alta intenção de compra por parte dos provadores. Ares, Giménes e Gambáro (2008) verificaram que as pessoas

que apresentaram maior conhecimento nutricional tiveram maior intenção de compra e/ ou consumo de alimentos funcionais. Isto foi também verificado neste estudo, já que 81% dos entrevistados estavam cursando ou cursaram cursos de graduação bem como de pós-graduação (Tabela 45). Ainda, o fato de que 64% dos provadores pertenceram ao sexo feminino (Tabela 45) também pode ter contribuído para esta alta aceitabilidade, já que segundo artigo de revisão elaborado por Siró *et al.* (2008) estudos indicam que as mulheres são as que mais compram e consomem alimentos funcionais. Ao contrário do resultado obtido por Urala e Lahteenmaki (2004), onde os consumidores mais jovens apresentaram menor intenção de consumo por alimentos funcionais, não foi percebida no presente estudo, já que a faixa etária predominante do painel sensorial (Tabela 45), como já era esperada pelo local aonde a análise sensorial foi aplicada, não contribuiu para a redução do interesse pela aquisição deste produto com caráter funcional.

Aliados à importância do perfil sócio-demográfico, os atributos sensoriais também se sobressaem em importância para os alimentos funcionais conforme afirmado por Krystallis, Maglaras e Mamalis (2008) e Urala e Lahteenmaki (2007), que, ao avaliarem a motivação, a estrutura cognitiva e a atitude dos consumidores frente a esta classe de alimento, verificaram que os atributos sensoriais estão entre os mais importantes fatores que afetam a escolha por esta classe de alimento, já que os consumidores disseram não estarem dispostos a consumir produtos que não apresentassem um sabor agradável ao paladar.

A matriz dos ensaios realizados com os valores reais e codificados das variáveis estudadas, e respostas de manuseio, aroma, sabor, aparência e avaliação global, assim como os resultados obtidos para a Formulação Controle, estão apresentados na Tabela 46.

Comparando-se as respostas do planejamento (Tabela 46) verifica-se que para todos os atributos as médias das notas foram similares entre si, ou seja, não houve diferença significativa entre os tratamentos para os atributos avaliados ($p > 0,05$), onde a média das notas atribuídas pelos julgadores ficaram

entre “gostei regularmente” e “gostei muito”, muito próximas das médias atribuídas à Formulação Controle.

TABELA 46 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 , COM 3 PONTOS CENTRAIS (VALORES CODIFICADOS E REAIS) COM AS RESPOSTAS MANUSEIO, AROMA, SABOR, APARÊNCIA E AVALIAÇÃO GLOBAL PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO UTILIZANDO A ESCALA HEDÔNICA ESTRUTURADA DE 09 PONTOS¹

F	X ₁ ²	X ₂ ³	MANUSEIO ⁴	AROMA ⁴	SABOR ⁴	APARÊNCIA ⁴	AVALIAÇÃO GLOBAL ⁴
1	-1 (0)	-1 (0)	7,9 ± 1,1	7,1 ± 1,7	7,5 ± 1,6	7,9 ± 1,2	7,9 ± 1,1
2	+1 (0)	-1 (7)	7,8 ± 1,0	7,7 ± 1,2	8,6 ± 0,9	8,1 ± 0,9	8,3 ± 0,6
3	-1 (7)	+1 (0)	7,9 ± 0,7	8,1 ± 1,1	7,8 ± 1,1	8,2 ± 0,7	8,1 ± 0,9
4	+1 (7)	+1 (7)	7,2 ± 1,5	7,3 ± 1,2	7,8 ± 1,0	7,8 ± 1,1	7,8 ± 0,8
5	0 (3,5)	0 (3,5)	7,6 ± 1,4	8,1 ± 0,9	8,2 ± 0,9	8,3 ± 0,8	8,2 ± 0,8
6	0 (3,5)	0 (3,5)	8,0 ± 1,1	8,1 ± 0,9	8,3 ± 0,8	8,0 ± 0,9	8,2 ± 0,5
7	0 (3,5)	0 (3,5)	7,6 ± 1,7	7,3 ± 1,5	7,7 ± 1,3	7,8 ± 1,4	7,6 ± 1,4
Controle	-	-	7,4 ± 1,6	7,4 ± 1,5	8,0 ± 1,5	7,8 ± 1,5	8,0 ± 1,0

FONTE: O autor (2009)

NOTA: ¹ Escala Hedônica: (9) gostei muitíssimo; (8) gostei muito; (7) gostei regularmente; (6) gostei ligeiramente; (5) indiferente; (4) desgostei ligeiramente; (3) desgostei regularmente; (2) desgostei muito; (1) desgostei muitíssimo; ² concentração de inulina (g/ 100 g de requeijão cremoso simbiótico); ³ concentração de oligofrutose (g/ 100 g de requeijão cremoso); ⁴ Média adimensional ± erro padrão – os resultados representam a média de três determinações.

Os valores obtidos para o atributo sensorial manuseio (Tabela 46), para as diferentes formulações avaliadas no planejamento, inclusive a Formulação Controle, foram semelhantes aos encontrados por Garruti *et al.* (2003) para as amostras de requeijão cremoso tradicional que apresentaram maior aceitabilidade para este atributo (7,44 e 7,93).

Para o atributo sensorial aroma (Tabela 46), os resultados encontrados para as formulações do planejamento e para a Formulação Controle foram superiores ao encontrado por Gotelip, Jardim e Miguel (2005) para aroma de

requeijão cremoso fabricado a partir da fusão de massa obtida por coagulação ácida (6,8) e a partir de massa obtida por coagulação enzimática e láctica (5,6). O teor de lipídios e de cloreto de sódio exerce importante papel na percepção sensorial do aroma de queijos (SAINT-EVE *et al.*, 2009). No presente trabalho, a similaridade entre os valores de lipídios e de cloreto de sódio apresentados pelas formulações do planejamento e a controle (Tabela 17) podem ter contribuído para que a média dos valores para cada formulação não diferissem significativamente (Tabela 46). Segundo Oliveira (1990), o aroma do requeijão deve ser de leite fresco levemente fermentado. Tal propriedade sensorial pode ter sido ressaltada durante a fabricação de requeijão cremoso simbiótico mesmo utilizando massa obtida por acidificação direta a quente, como a empregada neste trabalho, já que se optou pela adição do microrganismo probiótico na forma de uma solução de LPDR a 10%, onde os mesmos encontravam-se pré-ativados em função do processo fermentativo, e, devido ao metabolismo destes microrganismos, com presença de ácidos orgânicos que poderiam colaborar para a obtenção deste aroma característico.

O sabor é, dentre os atributos sensoriais, um dos mais complexos para serem avaliados, já que envolve sensações correlacionadas com o olfato, paladar e sensações químicas (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999). Em geral, os resultados obtidos para o atributo sensorial sabor (Tabela 47) foram similares aos encontrados por Cunha (2007), 6,56 a 7,72, e Garruti *et al.* (2003), 6,63 a 7,24, que avaliaram amostras de requeijão cremoso tradicional comercializadas em postos de vendas.

Em relação ao atributo sensorial aparência, os resultados obtidos (Tabela 46) foram similares aos encontrado por Cunha (2007), 6,61 a 7,24, para amostras de requeijão cremoso tradicional comercializadas em postos de vendas.

Os resultados obtidos para o atributo avaliação global (Tabela 46) foram similares aos encontrados por Cunha (2007), 6,65 a 7,24, Garruti *et al.* (2003), 6,83 a 7,21, e Gotelip, Jardim e Miguel (2005), 6,7, para amostras de requeijão cremoso tradicional.

Analisando os resultados da matriz de ensaio apresentada na Tabela 46, foram obtidos os efeitos das variáveis estudadas (inulina e oligofrutose) sobre as respostas dos atributos sensoriais manuseio, sabor, aroma, aparência e avaliação global das diferentes formulações de requeijão cremoso do planejamento, que estão apresentados na Tabela 46.

Pode-se verificar na Tabela 47 que as variáveis estudadas, inulina e oligofrutose, não exercem efeitos significativos sobre as respostas estudadas (os atributos sensoriais manuseio, aroma, sabor, aparência e avaliação global). Assim, o uso de qualquer valor dentro da faixa estudada (0 - 7 g/ 100 g de requeijão cremoso) resulta em valores para as médias das notas dos atributos sensoriais avaliados estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$).

Embora os efeitos não tenham sido estatisticamente significativos ao nível de 5% de significância, pode-se dizer que um aumento na concentração de ambos prebióticos, inulina e oligofrutose, nas concentrações analisadas, promove um decréscimo (efeito negativo) na média das notas do atributo sensorial manuseio (Tabela 47). Correlacionando este resultado com o obtido para o parâmetro de textura firmeza (Tabela 19), é possível reforçar a conclusão obtida por Garruti *et al.* (2003) que os provadores apreciam amostras consistentes e com menos formação de fios.

Quanto ao atributo sensorial aroma, os efeitos não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$) conforme apresentado na Tabela 48. Resultados similares foram encontrados por Garcia, Cáceres e Selgas (2006) ao avaliarem o efeito da adição de inulina, em pó e em gel, na elaboração de mortadela, onde não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto à média das notas para aroma. Porém, neste trabalho, é possível verificar através dos efeitos que o aumento na concentração de inulina exerce efeito negativo no valor das médias deste atributo sensorial, ou seja, um decréscimo na média das notas para este atributo; o contrário foi verificado para oligofrutose, onde o aumento na concentração de inulina aumenta a médias das notas do atributo sensorial aroma.

TABELA 47 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2² (4 ENSAIOS, COM 3 PONTOS CENTRAIS, TOTALIZANDO 7 ENSAIOS) PARA OS ATRIBUTOS SENSORIAIS MANUSEIO, SABOR, AROMA, APARÊNCIA E AVALIAÇÃO GLOBAL DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO

		EFEITO	ERRO PADRÃO	T (3)	P - VALOR
MANUSEIO	Média	7,7	0,1	82,7	0,0000*
	Inulina	-0,3	0,2	-1,8	0,1679
	Oligofrutose	-0,2	0,2	-1,3	0,2924
AROMA	Média	7,7	0,2	32,0	0,0001*
	Inulina	-0,3	0,5	-0,7	0,5421
	Oligofrutose	0,1	0,5	0,1	0,9117
SABOR	Média	8,0	0,2	46,0	0,0000*
	Inulina	0,2	0,32	0,5	0,6236
	Oligofrutose	-0,3	0,32	-0,9	0,4377
APARÊNCIA	Média	8,0	0,1	82,9	0,0000*
	Inulina	-0,1	0,2	-0,8	0,5004
	Oligofrutose	-0,0	0,2	-0,2	0,8187
AVALIAÇÃO GLOBAL	Média	8,0	0,1	62,4	0,0000*
	Inulina	0,0	0,2	0,1	0,9592
	Oligofrutose	-0,2	0,2	-0,7	0,5250

FONTE: O autor (2009).

NOTA: * $p \leq 0,05$.

Em relação ao atributo sensorial sabor, resultados similares foram obtidos por Akin, Akin e Kirmaci (2007), que verificaram que a adição de inulina em sorvete probiótico adicionado dos microrganismos *Lactobacillus acidophilus* LA-14 e *Bifidobacterium lactis* BL-01 não promoveu diferença

significativa entre os tratamentos para o atributo sensorial sabor. Hekmat e Reid (2006) verificaram que a adição de inulina e de extrato de levedura em iogurte adicionado de *Lactobacillus reuteri* RC-14 e *L. rhamnosus* GR-1 não interferiu de forma significativa no sabor, obtendo valor similar aos do iogurte probiótico e do iogurte tradicional. Apesar de ambas, inulina e oligofrutose, contribuírem para uma melhor sensação tátil bucal, já que tornam a textura mais cremosa e conferem corpo aos derivados lácteos, bem como não conferem *off flavors* (NINESS, 1999), pela análise de efeitos foi possível verificar que somente o aumento da concentração de inulina exerceu leve efeito positivo sobre o atributo sensorial sabor, dentro da faixa estudada (Tabela 48), ou seja, um aumento na concentração de inulina contribui para um maior valor das médias referentes ao atributo sabor. Buriti, Cardarelli e Saad (2008) obtiveram maior preferência em relação ao atributo sabor para o tratamento de queijo fresco cremoso adicionado de inulina e de *L. paracasei* subsp. *paracasei* e *Streptococcus thermophilus* quando comparado ao tratamento probiótico. Staffolo *et al.* (2004), ao analisarem o efeito de fibras de diferentes origens (inulina, bambu, trigo e maçã) na aceitabilidade do sabor de iogurte, obtiveram os maiores escores para o tratamento adicionado de inulina. Por sua vez, o aumento da concentração de oligofrutose está correlacionado com efeito negativo na média das notas referentes ao atributo sabor (Tabela 44), isso provavelmente devido ao fato de que a oligofrutose, ao contrário da inulina, possui de 35%-50% da doçura em relação à sacarose (FRANCK, 2002; NINESS, 1999) e esse sabor levemente adocicado poderia ter contribuído para a redução do valor da média das notas para o atributo sabor.

Apesar da análise de efeitos não ter sido significativa ao nível de 5% de probabilidade para o atributo sensorial aparência, ao analisar a Tabela 48 é possível verificar que a medida em que a concentração de inulina e de oligofrutose aumentaram houve uma redução na média das notas para este atributo (efeito negativo). Hekmat e Reid (2006) também obtiveram notas inferiores para o atributo aparência para o iogurte adicionado de inulina e dos microrganismos probióticos *Lactobacillus reuteri* RC-14 e *L. Rhamnosus* GR-1 e para o iogurte somente probiótico comparativamente ao iogurte tradicional.

Em relação à avaliação global, apesar da análise de efeitos não ter sido significativa ($p > 0,05$) (Tabela 47), foi possível verificar que um aumento na concentração de inulina exerceu efeito positivo na avaliação deste atributo, ou seja, um aumento no valor da média das notas referentes à avaliação global. Buriti (2005) também verificou que a formulação de *cream cheese* contendo inulina e *Lactobacillus paracasei* apresentou nota similar ao queijo controle (sem inulina e sem o microrganismo probiótico), porém no trabalho superior ao tratamento probiótico. Ao avaliar a aceitabilidade de *mousse* de chocolate simbiótico, Aragon-Alegro *et al.* (2007) não obtiveram diferenças significativas entre as formulações controle e probiótica. Por sua vez, o aumento da concentração de oligofrutose contribuiu para uma redução da média das notas para este atributo (efeito negativo), provavelmente devido ao seu comportamento frente aos atributos anteriormente avaliados. Diferentemente de Cardarelli *et al.* (2008), ao avaliarem a aceitabilidade de queijo *Petit Suisse* simbiótico, apesar de não significativo, a formulação que apresentou maior aceitabilidade foi aquela adicionada de oligofrutose.

Os resultados referentes ao índice de aceitabilidade encontram-se representados na FIGURA 14.

Levando-se em consideração que para um alimento ser considerado aceitável o mesmo deve apresentar em sua avaliação nota igual ou superior a 70% (Dutcosky, 1996), todos os tratamentos avaliados apresentaram uma boa avaliação global, indicando que, do ponto de vista sensorial, a elaboração de requeijão cremoso simbiótico é viável (FIGURA15).

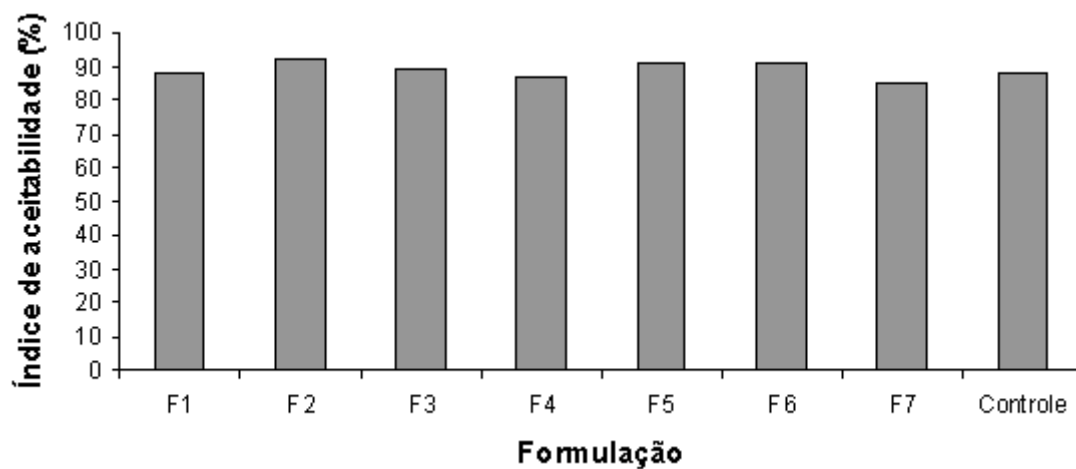


FIGURA 15 - ÍNDICE DE ACEITABILIDADE GLOBAL (%) PARA AS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO CREMOSO SIMBIÓTICO DO PLANEJAMENTO E FORMULAÇÃO CONTROLE

FONTE: O autor (2009).

NOTA: F1 = formulação probiótico; F2 = formulação probiótica adicionada de 7,0 g de inulina/ 100g de requeijão cremoso; F3 = formulação probiótica adicionada de 7,0 g de oligofrutose/ 100g de requeijão cremoso; F4 = formulação probiótica adicionada de 7,0 g de inulina e 7,0 g de oligofrutose/ 100g de requeijão cremoso; F5, F6 e F7 = formulação probiótica adicionada de 3,5 g de inulina e 3,5 g de oligofrutose/ 100g de requeijão cremoso; Controle = requeijão cremoso tradicional.

5 CONCLUSÕES

Levando-se em consideração que:

- A forma de adição, bem como a concentração de inóculo e a temperatura utilizada, de forma a obter concentração inicialmente determinada ($6 \log_{10}$ UFC/ g), foi a pré-ativação de 0,1g de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em leite em pó desnatado e reconstituído a 10%, por incubação a 37°C/ 07 horas, com posterior manutenção sob refrigeração (cerca de 15 horas à temperatura de $5 \pm 1^\circ\text{C}$), de forma a obter inóculo com concentração inicial de $12 \log_{10}$ UFC/ g, adicionado na proporção de 9% (m/m) em relação ao produto final após a fusão à temperatura de 70°C;

- A forma de adição dos prebióticos durante a elaboração do requeijão cremoso, que consistiu na adição em pó durante o processo de fusão da massa, foi eficaz sob o ponto de vista sensorial;

- As matérias-primas utilizadas na elaboração das formulações de requeijão cremoso simbiótico do planejamento e da Formulação Controle, assim como o soro ácido obtido, apresentaram-se de acordo com os padrões de identidade e qualidade preconizados pelas legislações vigentes, quando o caso, e similares aos dados das literaturas consultadas;

- Quanto à composição centesimal e propriedades físico-químicas das formulações do planejamento e Formulação Controle, as Formulações 01 (somente probiótica), por apresentar teor mais elevado de umidade ($65,72 \pm 0,46\%$), e a 04 (adicionada de 7 g de inulina/ 100 g de requeijão cremoso e de 7 g de oligofrutose/ 100g de requeijão cremoso), por apresentar teor mais baixo de GES ($52,38 \pm 3,13\%$), não atenderam aos padrões de identidade e qualidade de requeijão cremoso;

- As variáveis inulina e oligofrutose exerceram efeitos significativos sobre os parâmetros de textura firmeza no requeijão cremoso simbiótico com três ($p \leq 0,10$) e 60 dias de fabricação ($p \leq 0,05$); para adesividade, os efeitos foram significativos, apenas, no terceiro dia de fabricação ($p \leq 0,05$); em relação a coesividade, a oligofrutose exerceu efeito significativo no terceiro dia

de fabricação ($p \leq 0,05$), ao passo que nos 60 dias de fabricação ambas as fibras prebióticas exerceram efeito significativo ($p \leq 0,10$); a elasticidade e a gomosidade não sofreram efeitos significativos no terceiro de fabricação tanto para inulina quanto oligofrutose ($p > 0,05$), porém nos 60 dias de fabricação, a inulina exerceu efeito significativo sobre a elasticidade ($p \leq 0,05$) enquanto que a inulina e a oligofrutose sobre a gomosidade ($p \leq 0,05$);

- A concentração de prebióticos no produto final foi menor do que no tempo inicial para todas as formulações do planejamento adicionadas de inulina e de oligofrutose; porém, as Formulações 02 (somente inulina) e a 03 (somente oligofrutose) foram as que apresentaram maior redução;

- A Formulação 04 (adicionada de 7 g de inulina/ 100 g de requeijão cremoso e de 7 g de oligofrutose/ 100g de requeijão cremoso), por apresentar concentração de prebióticos de forma a atender a Lista de Alegações de Propriedade Funcional, pode receber a alegação referente à presença de inulina e frutooligossacarídeos;

- As formulações do planejamento, assim como a Formulação Controle, não apresentaram diferenças significativas nos valores de pH ao longo do armazenamento ($p > 0,05$), apesar das Formulações 02 e 03 apresentarem um ligeiro aumento do pH em relação ao Tempo 01. Em relação à acidez, a partir do Tempo 2 houve aumento significativo para para as Formulações 02 e 03 ($p \leq 0,05$);

- As formulações do planejamento apresentaram concentração de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 superior a $6 \log_{10}$ UFC/ g durante toda a vida útil do produto. As Formulações 02 (7 g de inulina/ 100 g de requeijão cremoso) e 03 (7 g de oligofrutose/ 100 g de requeijão cremoso) apresentaram maior enumeração final do probiótico em relação às demais formulações. Porém, não podem receber a alegação de propriedade funcional relacionada aos probióticos por não atenderem ao disposto na Lista de Alegações de Propriedade Funcional;

- Ao analisar o efeito da inulina e oligofrutose sobre a viabilidade dos probióticos, este só foi significativo ao nível de 5% de significância no 30º dia de fabricação, onde ambas exerceram efeito positivo, ou seja, um aumento na

concentração destes prebióticos dentro da faixa estudada (0 a 7 g/ 100 g) promovem maior enumeração do micorganismo probiótico em estudo;

- Todas as amostras apresentaram contagem microbiológica de acordo com o preconizado pela legislação vigente, denotando segurança para consumo;

- Em relação à análise sensorial, não foi detectado diferenças significativas entre as formulações do planejamento para os atributos avaliados (manuseio, aroma, sabor, aparência e avaliação global), onde as notas ficaram muito próximas da formulação controle, entre gostei regularmente e gostei muito, indicando que inulina e oligofrutose não exerceram efeito significativo ao nível de 5% de significância;

- Todas as formulações apresentaram índice de aceitabilidade superior a 70%; porém, a Formulação 02 (7g de inulina/ 100g de requeijão cremoso) foi a que apresentou maior aceitabilidade em relação às demais formulações, inclusive à Formulação Controle;

É possível elaborar requeijão cremoso simbiótico, desde que se aumente a concentração de micorganismo probiótico para atender a Lista de Alegações de Propriedade Funcional, atendendo aos padrões de identidade e qualidade preconizados pela legislação, assim como número de microrganismos probióticos e prebióticos viáveis durante a vida útil, com qualidade sensorial similar ao requeijão cremoso tradicional.

6 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- 1) Avaliar a eficiência de outras culturas probióticas de utilização comercial para elaboração de requeijão cremoso probiótico e simbiótico.
- 2) Avaliar a adição de outros ingredientes com propriedades prebióticas na elaboração de requeijão cremoso simbiótico.
- 3) Testar diferentes materiais de embalagens e a estabilidade do requeijão cremoso como carreador de microrganismos probióticos e ingredientes prebióticos.
- 4) Avaliar *in vivo* a capacidade simbiótica do requeijão cremoso elaborado pela adição de *Bifidobacterium animalis* subps. *lactis* Bb-12 e inulina e/ ou oligofrutose.
- 5) Realizar estudo para determinar valor comercial do produto para comercialização.

REFERÊNCIAS

AKALIN, A. S.; ERISIR, D. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. **Journal of Food Science**, Chicago (USA), v. 73, n. 4, p. 184-188, 2008.

AKIN, M. B.; AKIN, M. S.; KIRMACI, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. **Food Chemistry**, Oxford, v. 104, p. 93-99, 2007.

ALVES, R. M. V. **Estabilidade de requeijão cremoso em diferentes embalagens com e sem exposição à luz**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

ALVES, R. M. V. *et al.* Effect of light and packages on stability of spreadable processed cheese. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 17, p. 365-373, 2007.

AMIOT, J. **Ciência y tecnología de la leche**. Zaragoza: Acribia, 1991.

ANGELIS, R. C. Novos conceitos em nutrição. Reflexões a respeito do elo dieta e saúde. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 269-271, out./ dez. 2001.

ANJOS, V. D. A. *et al.* Avaliação instrumental de textura em requeijão no processo de produção e estocagem. In: VAN DENDER, A. G. F. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado**. São Paulo: Fonte de Comunicações e editora Ltda., 2006.

ARAGON-ALEGRO, L. C. *et al.* Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT - Food Science and Technology**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 669-675, may. 2007.

ARES, G.; GAMBARO, A. Influence of gender, age and motives underlying food choice on perceived healthiness and willingness to try functional foods. **Appetite**, Amsterdam, v. 49, p. 148-158, 2007.

ARES, G.; GIMENES, A.; GAMBARO, A. Influence of nutritional knowledge on perceived healthiness and willingness to try functional foods ***Appetite***, Amsterdam, v. 51, p. 663-668, 2008.

ASCAR, J. M. **Alimentos: aspectos bromatológicos e legais: análise percentual**. São Leopoldo: UNISINOS, 1985.

ASHRAF PAL, M. A review of the feasibility of producing processed cheese using non-enzymatic direct acidification procedures. ***International Journal of Food Science and Technology***, Oxford, v. 37, p. 229-237, 2002.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official methods as analysis of the association of official analytical chemists**. 16.ed. Washington: AOAC International Method, 1998.

AWAISHEH, S. S.; HADDADIN, M. S. Y.; ROBINSON, R. K. Incorporation of selected nutraceuticals and probiotic bacteria into a fermented milk. ***International Dairy Journal***, Oxford, v. 15, p. 1184-1190, 2005.

BARONI, A. F. *et al.* Caracterização reológica de requeijão cremoso tradicional e com teor reduzido de gordura: viscosidade extensional e em cisalhamento. ***Brazilian Journal of Food Technology***, Campinas, v. 2, n. ½, p. 21-29, 1999.

BENGMARK, S. Colonic food: pre- and probiotics. ***The American Journal of Gastroenterology***, Oxford, v. 95, n. 1, p. S5-S7, 2000.

BERGAMINI, C. V. *et al.* Probiotic bacterias as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. ***Food Research International***, Amsterdam, v. 38, p. 597-604, 2005.

BERGAMINI, C.V. *et al.* Proteolytic activity of three probiotic strains in semi-hard cheese as single and mixed cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. ***International Dairy Journal***, Oxford, v. 19, p. 467-475, 2009.

BIEDRZYCKA, E.; BIELECKA, M. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. ***Trends in Food Science & Technology***, Oxford, v. 15, p. 170-175, 2004.

BIELECKA, M.; BIEDRZICKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, Amsterdam, v. 35, p. 125-131, 2002.

BLANGETTE, L. *et al.* Production of Cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, California (USA), v. 79, p. 8-5, 1996.

BOSSCHER, D. *et al.* Availabilities of calcium, iron and zinc from dairy infant formulas is affected by soluble dietary fibers and modified starch fractions. **Nutrition**, Oxford, v. 19, p. 641-645, 2003.

BOSSCHER, D.; VAN LOO, J.; FRANCK, A. Inulin and oligofructose as functional ingredients to improve bone mineralization. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 16, n. 9, p. 1092-1097, 2006.

BOYLSTON, T. D. A. *et al.* Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 14, p. 375-387, 2004.

BRASIL(a). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado. Publicado no Diário Oficial da União em 20 de setembro de 2002.

BRASIL(b). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002 (D.O.U. 17/07/2002)**. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Portaria nº 146, de 07 de março de 1996 (D.O.U 11/ 03/ 96)**. Aprovar os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006 (D. O. U. 14/ 12/ 2006)**. Dispõe dos Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 359, de 04 de setembro de 1997 (D.O.U 08/09/97)**. Aprova o Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão ou Requesôn.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003 (D. O. U. 18/ 09/ 2003)**. Dispõe sobre os Métodos Analíticos para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003 (D.O.U. 26/ 12/ 03)**. Aprova Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas, 2008.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em 02 jan. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária em Alimentos. **Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999 (republicada em 03/ 12/ 1999)**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 (D. O. U. 10/ 01/ 2001)**. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.

BRICKLEY, C. A. *et al.* Influence of emulsifying salts on the textural properties of nonfat process cheese made from direct acid cheese bases. **Journal of Dairy Science**, Califórnia (USA), v. 91, n. 1, p. 39-48, 2008.

BURITI, F. C. A. **Desenvolvimento de queijo fresco cremoso simbiótico**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico: Área de Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005.

BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H. R. SAAD, S. M. I. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição

de *Lactobacillus paracasei* e inulina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 75-84, jan./mar., 2008

BURITI, F. C. A. *et al.* Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. **Food Chemistry**, Oxford, v. 104, p. 1605-1610, 2007.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 38, p. 173-180, 2005.

BURNS, A. J.; ROWLAND, I. R. Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 551, p. 233-243, 2004.

CAPELA, P.; HAY, T.K.C.; SHAH, N.P Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. **Food Research International**, Amsterdam, v. 39, n. 2, p. 203-211, 2006.

CARABIN, I. G.; FLAMM, W. G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v. 30, p. 268-282, 1999.

CARDERELLI, H. R.; BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially symbiotic *petit-suisse* cheese. **LWT - Food Science and Technology**, Oxford, v. 41, n. 6, p. 1037-1046, 2008.

CASIRAGHI, M. C. *et al.* Effects of a synbiotic milk product on human intestinal ecosystem. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 103, p. 499-506, 2007.

CAUSEY, J. L. *et al.* Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. **Nutrition Research**, Ontário, v. 20, n. 2, p. 191-201, 2000.

CHAGAS, S. S., SANTOS, J. Caracterização da microbiota fúngica presente em queijos artesanais comercializados na cidade de Pelotas-RS. **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**: Foz do Iguaçu, p. 402, 2001.

COLLINS, M. D.; GIBSON, G. R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 69, p. 1052S-1057S, 1999.

COMMANE, D.; HUGHES, R.; SHORTT, C.; ROWLAND, I. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 591, p. 276-289, 2005.

COMPENDIUM of methods for the microbiological examination of foods. 2 ed. Washington: American Public Health Association, 1984.

CONDACK, J. *et al.* Utilização do concentrado protéico de soro ultrafiltrado (CPSU) na fabricação de requeijão cremoso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 49, n. 289, p. 46-54, jan./ jun. 1995.

CORBO, M. R. *et al.* Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese Supplemented with bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, California (USA), v. 84, n. 3, p. 551- 561, 2001.

CROWLEY, M. L., GABOURY, D. J., WITT, D. Chef's attitudes in North-Eastern US toward irradiation beef, Olestra, rBST and genetically engineered tomatoes. **Food Service Technology**, [S. l.], v. 2, p. 173-181, 2002.

CUNHA, C. R. **Papel da gordura e do sal emulsificante em análogos de requeijão cremoso**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

DAIGLE, A. *et al.* Production of probiotic cheese (Cheddar- like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. **Journal of Dairy Science**, California (USA), v. 82, p. 1081-1091, 1999.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 7, p. 435-443, 1997.

DIMITRELI, G.; THOMAREIS, A. S. Effect of temperature and chemical composition on processed cheese apparent viscosity. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 64, p. 265-271, 2004.

DRUNKLER, D. A. *et al.* "Requeijão" cheese of goat's milk and "requeijão" cheese of cow's milk - chemical composition. In: VI BRAZILIAN MEETING ON CHEMISTRY OF FOOD AND BEVERAGES, 2006, Sao José do Rio Preto (SP). **Anais...**São José do Rio Preto: UNESP, 2006, p. 106.

DRUNKLER, D. A; SENE, L.; OLIVIERA, L. F. Probióticos, prebióticos e simbióticos: alimentos funcionais em ascensão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora (MG), v. 60, p. 29-37, 2005.

DRUNKLER, N. L.; KATSUDA, M. S.; DRUNKLER, D. A. Rendimento na fabricação de queijos: fatores que influenciam e alguns métodos de avaliação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora (MG), v. 60, n. 343, p. 39-46, mar./abr. 2005.

DUGAS, B. *et al.* Immunity and probiotics. **Trends Immunology Today**, [S.l.], v. 20, n. 9, p. 387-390, 1999.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 1996.

ECK, A. **O queijo**. v. 1 e 2. Portugal: Europa-América, 1987.

FARKYE, N. Y. Cheese technology. **International Journal of Dairy Technology**, [S.l.], v. 57, n. 2/ 3, p. 91-98, may./ aug. 2004.

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3 ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996.

FERREIRA, C. L. L. F.; TESHIMA, E. Prebióticos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, São Paulo, n. 16, p. 22-25, set./out., 2000.

FLEMMING, J. S. *et al.* Composição da forragem e os parâmetros de gordura do creme de leite e da manteiga. **Archives of Veterinary Science**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 31-34, 2004.

FOEGEDING, E. A.; BROWN, J.; DRAKE, M.; DAUBERT, C. R. Sensory and mechanical aspects of cheese texture. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 13, p. 585-591, 2003.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. **FEMS Microbiology Ecology**, [S.I.], v. 39, p. 67-75, 2002.

FOX, P. F., GUINEE, T. P., COGAN, T. M., McSEWEENEY, P. L. H. (2000). **Fundamentals of cheese science**. USA: Aspen Publications.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 87, suppl. 2, p.S287-S291, 2002.

FURTADO, M. M. **Arte e Ciência do Queijo**. São Paulo: Globo, 1990.

GARCIA, M. L.; CÁCERES, E.; SELGAS, M. D. Effect of inulin on the textural and sensory properties of mortadella, a Spanish cooked meat product. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 41, p. 1207-1215, 2006.

GARRUTI, D. S. *et al.* Desenvolvimento do perfil sensorial e aceitação de requeijão cremoso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 434-440, set./ dez., 2003.

GIBSON, G. R.; FULLER, R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 130, p. 391S-395S, 2000.

GLIBOWSKI, P. Rheological properties and structure of inulin–whey protein gels. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 19, p. 443-449, 2009.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 10, p. 139-157, 1999.

GORBACH, S. L. Probiotics and gastrointestinal health. **The American Journal of Gastroenterology**, Oxford, v. 95, n. 1, p. S2-S4, 2000.

GOTELIP, E. L.; JARDIM, F. B. B.; MIGUEL, D. P. Propriedades reológicas e sensoriais de requeijão cremoso com diferentes marcas tecnológicas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 208-211, 2005.

GUIGOZ, Y. *et al.* Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people. **Nutrition Research**, Ontário, n. 22, p. 13-25, 2002.

GUGGISBERG, D. *et al.* Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 107-115, 2009.

HAILU, G. *et al.* Consumer valuation of functional foods and nutraceuticals in Canada. A conjoint study using probiotics. **Appetite**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 257-265, 2009.

HEKMAT, S.; REID, G. Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standard yogurt. **Nutrition Research**, Ontário, v. 26, p. 163-166, 2006.

HENNELLY, P. J. *et al.* Textural, rheological and microstructural properties of imitation cheese containing inulin. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 75, n. 3, p. 388-395, 2006.

HERNOT, D. C. *et al.* In vitro fermentation profiles, gas production rates, and microbiota modulation as affected by certain fructans, galactooligosaccharides, and polydextrose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. I.], v. 57, n. 4, p. 1354-1361, 2009.

HIRAYAMA, K.; RAFTER, J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, p. 681-686, 2000.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, Amsterdam, v. 35, p. 109-116, 2002.

HOUGH, G. *et al.* Em umber of consumers necessary for sensory acceptability tests. **Food Quality and Preference**, [S.I.], v. 17, p. 522-526, 2006.

IFIC - International Food Information Council. **Consumer Attitudes toward Functional Foods/ Foods for Health**, Washington (USA), oct. 2007.

JUSKIEWICZ, J.; ZDUNCZYK, Z. Effects of cellulose, carboxymethylcellulose and inulin fed to rats as single supplements or in combinations on their caecal parameters. **Comparative Biochemistry and Physiology**, [S.I.], v. 139, p. 513-519, 2004.

KALANTZOPOULOS, G. Fermented products with probiotic qualities. **Anaerobe**, [S.l.], v. 3, p. 185-190, 1997.

KAPOOR, R.; METZGER, L. E. Process Cheese: Scientific and Technological Aspects – A Review. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [S.l.], v. 7, p. 194-214, 2008.

KASYMOGLO, A.; GONCUOGLO, M.; AKGUN, S. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 14, p. 1067-1073, 2004.

KELLY, D.; KING, T.; AMINOV, R. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 622, p. 58-69, 2007.

KIM, Y.; FAQIH, M. N.; WANG, S. S. Factors affecting gel formation of inulin. **Carbohydrate polymers**, Oxford, v. 46, p. 135-145, 2001.

KIMURA, Y. O. Alimentos simbióticos. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, n. 40, p. 22-23, jul./ ago. 2002.

KIP, P.; MEYER, D.; JELLEMA, R. H. Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 16, n. 9, p. 1098-1103, 2006.

KLIJN, A.; MERCENIER, A.; ARIGONI, F. Lessons from the genomes of bifidobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, p. 491-509, 2005.

KOCA, N.; METIN, M. Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 14, p. 365-373, 2004.

KOLIDA, S.; GIBSON, G. R. Prebiotic Capacity of Inulin-Type Fructans. **Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 137, p. 2503S-2506S, 2007.

KOSIKOWSKI, F. V.; MISTRY, V. V. **Cheese and fermented milk foods**. Vol. 1 – Origins and principles. 3 ed. Connecticut (USA): F. V. Kosikowski L. L. C., 1997.

KRYSTALLIS, A.; MAGLARAS, G.; MAMALIS, S. Motivations and cognitive structures of consumers in their purchasing of functional foods. **Food Quality and Preference**, [S. l.], v. 19, p. 525-538, 2008.

LANARA. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. I – Métodos microbiológicos. Brasília: Ministério da Agricultura, 1981.

LEE, S. K.; ANEMA, S.; KLOSTERMEYER, H. The influence of moisture content on the rheological properties of processed cheese spreads. **International Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 39, p. 763-771, 2004.

LEE, S. K. *et al.* Changes in the rheology and microstructure of processed cheese during cooking. **Lebensm.-Wiss. U. – Technol.**, [S. l.], v. 36, p. 339-345, 2003.

LEE, S. K.; KLOSTERMEYER, H. The effect of pH on the rheological properties of reduced-fat model processed cheese spreads. **Lebensm.-Wiss.u.-Technol.**, [S. l.], v. 34, p. 288-292, 2001.

LEE, Y-K.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, [S. l.], v. 6, p. 241-245, 1995.

LOSADA, M. A.; OLLEROS, T. Towards a healthier diet for the colon: the influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health. **Nutrition Research**, Ontário, v. 22, p. 71-84, 2002.

MANNING, T. S.; GIBSON, G. R. Prebiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 287-298, 2004.

MATRICARDI, P. M. Probiotics against allergy: data, doubts and perspectives. **Allergy**, [S. l.], v. 57, p. 185-187, 2002.

MATSUBARA, S. Alimentos funcionais – Uma tendência que abre perspectivas aos laticínios. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, n. 34, p. 10-18, jul./ago. 2001.

Mc BREARTY, S.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COLLINS, J. K.; WALLACE, J. M.; STANTON, C. Influence of two commercially available

bifidobacteria cultures on Cheddar cheese quality. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 11, p. 599-610, 2001.

MEILE, L.; LE BLAY, G.; THIERRY, A. Safety assessment of dairy microorganisms: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v.126, p. 316-320, 2008.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 3 ed. Boca Raton (New York): CRC Press, 1999.

MENDES, E. S. **Qualidade microbiológica do requeijão cremoso comercializado na região metropolitana do Recife – PE**. I Jornada Nacional da Agroindústria: Bananeiras, 2006.

MEYER, H. K. Bitterness in processed cheese caused by an overdose of a specific emulsifying agent? **International Dairy Journal**, Oxford, v. 11, p. 533-542, 2001.

MIRALLES, B.; RAMOS, M.; AMIGO, L. Application of capillary electrophoresis to the characterization processed cheeses. **Journal of Dairy Research**, Reino Unido, v. 67, p. 91-100, 2000.

MONTEIRO, C. A.; MONDINI, L.; COSTA, R. B. L. Mudanças na composição e adequação nutricional da dieta familiar nas áreas metropolitanas do Brasil (1988-1996). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 251-258, jun. 2000.

MONTEIRO, C. L. B. **Técnicas de avaliação sensorial**. 2 ed. Curitiba: CEPPA, 1994.

MORENO, I. *et al.* Impacto da qualidade da matéria-prima no produto final. In: VAN DENDER, A. G. F. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora Ltda, 2006.

MORENO, I.; VIALTA, A.; VALLE, J. L. E. Microrganismos responsáveis pelas principais deteriorações do requeijão e outros queijos fundidos. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, p. 72-75, set./ out., 2002.

MUNCK, A. V.; CAMPOS, W. A. Requeijão: um produto brasileiro. **Informe Agropecuário**, São Paulo, v. 10, n. 115, p. 35-38, julho, 1984.

NEVEN, E. Inulina e oligofrutose – ingredientes multifuncionais para o desenvolvimento de produtos lácteos. **Leite e Derivados**, São Paulo, n. 61, p. 32-37, nov./dez., 2001.

NINESS, K. R. Nutritional and health benefits of inulin and oligofructose. **Journal of Nutrition**, Wallingford, n. 129, p. 1402S-1406S, 1999.

NITSCHKE, M.; UMBELINO, D. C. Frutooligossacarídeos: novos ingredientes funcionais. **Boletim da SBCTA**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 27-34, 2002.

NIVA, M. All foods affect health: Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. **Appetite**, Amsterdam, v. 48, p. 384-393, 2007.

OLIVEIRA, J. S. **Queijo: fundamentos tecnológicos**. 2 ed. São Paulo: Ícone, 1990.

OLIVEIRA, L. L. **Utilização de transglutaminase na fabricação de queijos frescos empregando diferentes processos de coagulação**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa (MG), 2003.

OLIVEIRA, R. P. S. *et al.* Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 128, p. 467-472, 2009.

OLIVEIRA, R. P. S. *et al.* Effect of inulin on growth and acidification performance of different probiotic bacteria in co-cultures and mixed culture with *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 91, p. 133-139, 2009.

ONG, L. HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifidobacterium* sp. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 10, p. 271-275, 2000.

ONG, L. HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. And the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 16, p. 446-456, 2006.

ORAFI ACTIVE FOOD INGREDIENTS. Technical properties of RAFTILINE and RAFTILOSE, 2000.

ÓRDOÑEZ PEREDA, J. A. *et al.* **Tecnología de alimentos**. v. 2 – Alimentos de origen animal. Porto Alegre: Artmed, 2005.

OSTLIE, H. M., HELLAND, M. H.; NARVAUS, J. A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 87, p. 17-27, 2003.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; CARVALHO, P. O. Recentes progressos dos alimentos funcionais. **Boletim do SBCTA**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 200-206, jul./ dez. 1997.

PASEEPHOL, T.; SHERKAT, F. Probiotic stability of yoghurts containing Jerusalem artichoke inulins during refrigerated storage. **Journal of Functional Foods**, [S.l.], v. 01, p. 311-318.

PASEEPHOL, T.; SMALL, D. M.; SHERKAT, F. Rheology and texture of set yogurt as affected by inulin addition. **Journal of Texture Studies**, [S.l.], v. 39, p. 617-634, 2008.

PENNA, A. L. B.; BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M.N. Análise de consistência de iogurte: correlação entre medida sensorial e instrumental. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, n.2, p.98 -101, mai./ ago. 1997.

PERDIGON, G. *et al.* Immune system stimulation by probiotics. **Journal of Dairy Science**, California (USA), v. 78, n. 7, p. 1597-1606, 1995.

PEREIRA, D. B. C. *et al.* **Físico-química do leite e derivados. Métodos analíticos**. 2 ed. Juiz de Fora (MG): EPAMIG, 2001.

PEREIRA, D. I. A.; GIBSON, G. R. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. **Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology**, [S.l.], v. 34, n. 4, p. 259-281, 2002.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PHILLIPS, M.; KAILASAPATHY, K.; TRAN, L. Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 108, n. 2, p. 276-280, 2006.

PICCOLO, K. C. **Avaliação do efeito da enzima transglutaminase no processo de produção de requeijão cremoso**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos), Centro Universitário Instituto Mauá. São Caetano do Sul (SP), 2006.

POHJAVUORI, E. *et al.* *Lactobacillus* GG effect in increasing IFN- γ production in infants with cow's milk allergy. **Journal Allergy Clinical Immunology**, [S.l.], v. 114, n. 2, p. 131-136, 2004.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R. *et al.* Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science and Technology**, [S.l.], v. 13, p. 3-11, 2002.

RABÊLO, A. M. S. *et al.* Avaliação das características físico-químicas e viscosidade de requeijão cremoso tradicional e *light* comercializado em Goiânia, GO. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 242-245, jul./ ago. 2002.

RAFTER, J. Probiotics and colon cancer. **Best Practice e Research Clinical Gastroenterology**, [S.l.], v. 17, n. 5, p. 849-859, 2003.

RAO, A.V. The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. **Nutrition Research**, Ontario, n. 21, p. 843-848, jan. 2001.

RAPACCI, M. Estudo comparativo das características físicas e químicas, reológicas e sensoriais do requeijão cremoso obtido por fermentação láctica e acidificação direta. Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, 1997.

RAPACCI, M.; VAN DENDER, A. G. F. Estudo comparativo das características físicas, químicas e do grau de mineralização de diferentes tipos de massas utilizadas no processamento de requeijão cremoso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 53, p. 223-237, 1997.

RASTALL, R. A.; MAITIN, V. Probiotics and synbiotics: towards the next generation. **Current Opinion in Biotechnology**, [S.l.], v. 13, n. 5, p. 490-496, 2002.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. **British Journal Nutrition**, Wallingford, v. 80, p. S197-S202, 1998.

ROBERFROID, M. **Inulin-type fructans: functional food ingredients**. New York: CRC Press, 2005.

ROBERFROID, M.; SLAVIN, J. Nondigestible oligosaccharides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S.l.], v. 40, n. 6, p. 461-480, 2000.

ROSSI, M. *et al.* Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 71, n. 10, p. 6150-6158, oct. 2005.

SAARELA, M. *et al.* Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 84, p. 197-215, 2000.

SAAVEDRA, J. Probiotics and infectious diarrhea. **The American Journal of Gastroenterology**, Oxford, v. 95, n. 1, p. S16-S18, 2000.

SAINT-EVE, A. *et al.* Reducing salt and fat content: Impact of composition, texture and cognitive interactions on the perception of flavoured model cheeses. **Food Chemistry**, Oxford, v. 116, n. 1, p. 167-175, 2009.

SALGADO, J. M.; ALMEIDA, M. A. Mercado de alimentos funcionais: desafios e tendências. Disponível em: www.sba.com.br. Acesso em 02 jul. 2008.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. **Journal of Pediatric**, New York, v. 149, p. S115-120, 2006.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. 1 ed. São Paulo: Manole, 2007.

SCHEINBACH, S. Probiotics: functionality and commercial status. **Biotechnology Advanced**, [S.l.], v. 16, n. 3, p. 581-608, 1998.

SCOTT, R.; ROBBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. **Fabricación de queso**. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 2002.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 17, n. 11, p. 1262-1277, 2007.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, California (USA), v. 83, p. 894-907, 2000.

SHAH, N. P.; LANKAPUTHRA, W. E. V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* ssp. In yogurt. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 7, p. 349-356, 1997.

SHAH, N. P. *et al.* Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 5, p. 515-521, 1995.

SHIRASHOJI, Y.L.; LUCEY, J.A. Effects of pH on the textural properties and meltability of pasteurized process cheese made with different types of emulsifying salts. **Journal of Food Science**, Chicago (USA), v. 73, n. 8, p. 363-369, 2008.

SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends in Food Science and Technology**, [S.l.], v. 10, p. 411-417, 1999.

SILVA, N. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Editora Livraria Varela, 1997.

SILVA, A. T.; VAN DENDER, A. G. F.; MELLO, F. M. Características de fusão de quatro diferentes tipos de massas utilizadas na fabricação de requeijão cremoso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 97-103, 2004.

SILVA, A. T.; VAN DENDER, A. G. F.; MORENO, I. Estabilidade microbiológica de requeijão cremoso fabricado por diferentes processos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 58, p. 154-157, 2003.

SILVA, A. T. *et al.* Avaliação comparativa das características do requeijão cremoso produzido com massa obtida por acidificação direta a quente e por ultrafiltração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 262-265, 2004.

SILVA, C. R.; FURTADO, M. M.; SOUZA, J. G. Utilização de pirofosfato tetrassódico como sal fundente no processamento do requeijão culinário. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, n. 43, p. 58-62, jan./ fev. 2003.

SILVA, K.; BOLINI, H. M. A.; ANTUNES, A. J. Soro de leite bovino em sorvete. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 187-196, 2004.

SILVA, M. A. A.; DAMÁSIO, M. H. **Curso de Análise Sensorial de Alimentos**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", agosto 1994.

SIMPSON, P. J. *et al.* Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 99, p. 493-501, 2005.

SIRÓ, I. *et al.* Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance- a review. **Appetite**, Amsterdam, v. 51, p. 456-467, 2008.

SOUZA, C. L. *et al.* Avaliação microbiológica e físico-química de doce de leite e requeijão produzidos com leite de búfala na Ilha de Marajó-PA. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 191-202, jul./dez. 2002

SPREER, E. **Lactologia industrial**. 2 ed. Zaragoza (Espanha): Acribia, 1991.

STAFFOLO, M. D. *et al.* Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 14, p. 263-268, 2004.

STANTON, C. *et al.* Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 8, p. 491-496, 1998.

STEEGMANS, M.; ILIAENS, S.; HOEBREGS, H. Enzymatic, Spectrophotometric Determination of Glucose, Fructose, Sucrose, and Inulin/Oligofructose in Foods. **Journal of AOAC International**, [S.l.], v. 87, n. 5, p. 1200-1207, 2004.

STRINGHETA, P. C. *et al.* Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 181-194, abr./jun. 2007.

SULLIVAN, A.; NORD, C. E. The place of probiotics in human intestinal infections. **International Journal Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 20, p. 313-319, 2002.

SUN, Y.-H. C. Health concern, food choice motives, and attitudes toward healthy eating: The mediating role of food choice motives. **Appetite**, Amsterdam, v. 51, p. 42-49, 2008.

TARANTO, M. P. *et al.* Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. **Journal of Dairy Science**, Oxford, v. 81, n. 9, p. 2336-2340, 1998.

TEIXEIRA, MEINERT e BARBETA. **Análise Sensorial de Alimentos**. Florianópolis: UFSC, 1987.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 2. ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2003.

TUOHY, K. M.; PROBERT, H. M.; SMEJKAL, C. W.; GIBSON, G. R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, [S.l.], v. 8, n. 15, p. 692-700, 2003.

URALA, N.; LAHTENMAKI, L. Attitudes behind consumers' willingness to use functional foods. **Food Quality and Preference**, [S. l.], v. 15, p. 793-803, 2004.

URALA, N.; LAHTENMAKI, L. Consumers changing attitudes towards functional foods. **Food Quality and Preference**, [S. l.], v. 18, p. 1-12, 2007.

VAN DE WIELLE, I. *et al.* Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effect. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 102, p. 452-460, 2007.

VAN DENDER, A. G. F. Alternativas tecnológicas para a fabricação de requeijão cremoso e queijos fundidos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora (MG), v. 56, n. 321, p. 381-389, jul./ago. 2001.

VAN DENDER, A. G. F. Requeijão: aspectos gerais. IN: VAN DENDER, A. G. F. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora Ltda, 2006.

VAN DENDER, A. G. F. *et al.* **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado.** São Paulo: Fonte Comunicações e Editora Ltda, 2006.

VAN DENDER, A. G. F. *et al.* Correlação entre a composição físico-química e os parâmetros da análise do perfil de textura (TPA) de queijos processados. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, p. 397-403, 2005.

VAN DENDER, A. G. F. *et al.* Caracterização físico-química e análise de perfil de textura de amostras comerciais de requeijão cremoso e de requeijão cremoso *light*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 58, p. 164-170, 2003.

VANDERHOOF, J. A.; YOUNG, R. J. Role of probiotics in the management of patients with food allergy. **Ann Allergy Asthma Immunol**, [S.l.], v. 90, n. 3, p. 99-103, 2003.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos.** Zaragoza: Acribia, 1995.

VERNAZZA, C. L.; GIBSON, G. R.; RASTALL, ROBERT, A. Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 100, p. 846-853, 2006.

VINDEROLA, C. G. *et al.* Characteristics of carbonataded fermented milk and survival of probiotic bacteria.. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 10, p. 213-220, 2000a.

VINDEROLA, C. G. *et al.* Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Frsco Cheese. **Journal of Dairy Science**, California (USA), v. 83, n. 9, p. 1905-1911, 2000b.

WALKER, W. A; DUFFY, L. C. Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, New York, v. 9, p. 668-675, 1998.

WANSINK, B.; WESTGREN, R. E.; CHENEY, M. M. Hierarchy of nutritional knowledge that relates to the consumption of a functional food. **Nutrition**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 264-268, 2005.

YANJIE, L.; SHIRASHOJI, N.; LUCEY, J. A. Rheological, textural and melting properties of commercial samples of some of the different types of pasteurized processed cheese. **International Journal of Dairy Technology**, [S.l.], v. 60, n. 2, p. 74-80, 2007.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 8, p. 473-479, 1998.

APÊNDICE

TESTE DE ESCALA HEDÔNICA

Nome: _____ Data: __/__/__

Por favor, preencha os dados abaixo: (a sua identidade será mantida em sigilo)

1. SEXO: F () M ()

2. GRAU DE ESCOLARIDADE:

() 1º grau incompleto () 1º grau completo () 2º grau incompleto () 2º grau completo
() 3º grau incompleto () 3º grau completo () Superior ao 3º grau

3. IDADE (anos):

() 16 a 25 () 26 a 35 () 36 a 46 () Acima de 46

4. COM QUE FREQUÊNCIA VOCÊ CONSOME REQUEIJÃO CREMOSO?

() diariamente () uma vez por semana () uma vez por mês () raramente

5. VOCÊ COMPRARIA REQUEIJÃO CREMOSO COM PROPRIEDADES FUNCIONAIS (benéficas à saúde)?

() Sim () Não

Agora, você está recebendo duas amostras codificadas de REQUEIJÃO CREMOSO. Por favor, avalie cada uma das amostras utilizando a escala de valores abaixo:

- (9) gostei muitíssimo
- (8) gostei muito
- (7) gostei regularmente
- (6) gostei ligeiramente
- (5) indiferente
- (4) desgostei ligeiramente
- (3) desgostei regularmente
- (2) desgostei muito
- (1) desgostei muitíssimo

Para isso, descreva o quanto você gostou e/ou desgostou, com relação aos atributos (utilize a faca para espalhar o requeijão sobre a bolacha água e sal e enxágüe a boca com água mineral entre as amostras):

Nº Amostra	Manuseio Valor	Aroma Valor	Sabor Valor	Aparência Valor	Avaliação global Valor
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____

Comentários: _____

